

Aus dem Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Selektive Bestimmung von IPG F_{2α} mittels LC-DMS-MS/MS in Urin
von Tauchern vor und nach einer Sauerstoffbelastung durch Tauchgänge

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Karsten Stemmerich
aus Rheine

Kiel, 2019

Dekan/in: Prof. Dr. Dr. Christian Henning
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Karin Schwarz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Koch
Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2020

Gedruckt mit Genehmigung der Agrar-und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

As research advances, about half of what we will teach you (. . .) will turn out to be wrong.

The problem is, we presently don't know which half.

(Jerry Avorn)

Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst Frau Professor Dr. Karin Schwarz für die fachliche Anleitung und die persönliche Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit.

Viele Personen haben auf die eine oder andere Weise zur Entstehung dieses Manuskriptes beigetragen, dafür möchte ich mich ganz herzlich bei allen Beteiligten bedanken. Stellvertretend dafür möchte ich an dieser Stelle folgende Personen hervorheben

Prof. Dr. Torsten Arndt

Prof. Dr. Andreas Koch

und insbesondere Dr. Wataru Kähler

für die langjährige Unterstützung, Motivation, Durchsicht der Manuskripte, fachliche Diskussion und konstruktive Kritik. Ohne diese Personen hätte ich die Arbeit nicht fertigstellen können.

Und schließlich gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie, die sich mich über eine lange Zeit hinweg mit dieser Arbeit teilen musste.

Kurzzusammenfassung

Eine Missregulation zwischen oxidativen Prozessen und antioxidativer Abwehr kann im Organismus zu oxidativem Stress führen. Durch nicht-enzymatische oxidative Vorgänge können dabei aus Arachidonsäure Isoprostane gebildet werden. Aus der Vielzahl von Isoprostanen gilt das Isomer IPG $F_{2\alpha}$ als stabile Markersubstanz und Goldstandard der Analytik von oxidativem Stress *in vivo*.

Die vorliegende Arbeit sollte prüfen, ob bei Tauchern als Modell zur Erzeugung von oxidativem Stress durch die Sauerstoffbelastung ein Anstieg der IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen in Urin nach Tauchgängen messbar ist. Zur selektiven Bestimmung des Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ wurde erstmalig eine quantitative LC-DMS-MS/MS-Methode etabliert und validiert. Die im Rahmen der Methodenentwicklung geprüften Extraktionsarten (Festphasenextraktion, Festphasen-unterstützte Flüssigextraktion) zeigten für die Matrix Urin starke Suppressionseffekte. Es war daher fraglich, ob die in den Taucherproben vermuteten geringen Konzentrationen von IPG $F_{2\alpha}$ zuverlässig gemessen werden konnten. Zur Verringerung der Matrixeffekte wurde die Chromatographie verändert, um eine bessere Abtrennung der supprimierend wirkenden Matrixbestandteile zu erreichen. Dadurch wurde eine aufwändige und damit fehleranfällige Probenvorbereitung überflüssig. Durch eine einfache Verdünnung der Proben mit einer Lösung des internen Standards (Dilute & Shoot) konnte in jedem Urin ein deutliches Signal des Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ gemessen werden.

Die Anwendung der validierten Methode an Taucherurinen ($n = 234$) zeigte, dass die IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentration pro Creatinin im Median direkt nach einem Tauchgang signifikant um +6 % (Mittel +10 %) erhöht war im Vergleich zum Ausgangswert vor der körperlichen Belastung unter Sauerstoffexposition. Zum ersten Mal wurde diese Erhöhung mit der dafür verantwortlichen Sauerstoffbelastung korreliert. Dabei zeigte sich eine signifikant lineare Abhängigkeit zwischen dem Anstieg der Messwerte und der Sauerstoffbelastung durch die Tauchgänge.

In jeder Probe konnte zusätzlich ein vom Zielanalyten deutlich abgetrenntes Signal des Isomers 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ gemessen werden. Daher wurde dieses Isomer als potentieller Alternativmarker des oxidativen Stresses evaluiert. Hierbei zeigte sich ein geringerer und nicht signifikanter Anstieg der Konzentration pro Creatinin von +1 % im Median (Mittel +4 %) nach einem Tauchgang. Somit war das Isomer 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ ein weniger sensibler Marker des oxidativen Stresses als der Zielanalyt IPG $F_{2\alpha}$. Die auch hier zum ersten Mal durchgeführte Korrelation der Konzentrationserhöhung mit der Sauerstoffbelastung zeigte einen signifikant linearen Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Messwerte und der Sauerstofflast durch die Tauchgänge.

Anhand der Taucherurine ($n = 234$) wurden Messungen mit und ohne Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS) verglichen. Hierbei wurde geprüft, ob die verwendete Messmethode auch ohne DMS-Modul nutzbar war. Durch die Verwendung der DMS kam es zu +3 % höheren IPG $F_{2\alpha}$ -Messwerten. Dieser statistisch signifikante Unterschied war für die praktische Anwendung nicht relevant, insbesondere für Vorher-Nachher-Vergleiche von Proben desselben Individuums. Die entwickelte Methode konnte auch ohne DMS-Zusatzausrüstung verwendet werden. Dennoch zeigte das DMS-Modul in den Messreihen eine höhere Selektivität und das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) verbesserte sich um einen Faktor von 3,5 im Vergleich zu Messungen ohne DMS.

Abstract

A misregulation between oxidative processes and the antioxidative defense of the organism can lead to oxidative stress. Here Isoprostanes can be formed from arachidonic acid by non-enzymatic oxidative processes. From the multitude of isoprostanes the isomer IPG F_{2α} is regarded as a stable marker substance and gold standard for the analysis of oxidative stress *in vivo*.

The purpose of this study was to examine whether an increase of IPG F_{2α} concentrations in urine after dives is measurable due to oxygen exposure in divers as a model for the generation of oxidative stress. For the selective determination of the target analyte IPG F_{2α} a quantitative LC-DMS-MS/MS method was established and validated for the first time. The extraction types (Solid Phase Extraction and Supported Liquid Extraction) tested during the method development showed strong suppression effects for the matrix urine. It was therefore questionable whether the low concentrations of IPG F_{2α} suspected in the diver samples could be reliably measured. In order to reduce matrix effects, chromatography was modified to achieve better separation of the suppressing matrix components. This made time-consuming and error-prone sample preparation unnecessary. By simply diluting the samples with a solution of the internal standard (dilute & shoot), a clear signal of the target analyte IPG F_{2α} could be measured in each urine.

The application of the validated method to urine samples of divers (n = 234) showed that the IPG F_{2α} concentration per creatinine in the median immediately after a dive was significantly increased by +6 % (mean +10 %) compared to the initial value before physical exercise under oxygen exposure. For the first time this increase was correlated with the oxygen load responsible for it. A significant linear dependence between the increase of the measured values and the oxygen load during the dives was observed.

In each sample an additional signal of the isomer 15(R)-IPG F_{2α}, clearly separated from the target analyte, was measured. Therefore, this isomer was evaluated as a potential alternative marker of oxidative stress. A lower and not significant increase of the concentration per creatinine of +1 % in the median (mean +4 %) after a dive was observed. Thus, the isomer 15(R)-IPG F_{2α} was a less sensitive marker of oxidative stress than the target analyte IPG F_{2α}. The correlation of the increase in concentration with the oxygen load, which was also carried out here for the first time, showed a significant linear correlation between the increase in measured values and the oxygen load due to the dives.

Using the diver urines (n = 234), measurements with and without differential mobility spectrometry (DMS) were compared. It was examined whether the measurement method used could also be used with LC-MS/MS systems without a DMS-module. The use of DMS resulted in +3 % higher IPG F_{2α} readings. This statistically significant difference was not relevant for practical application, especially for before-and-after comparisons of samples of the same individual. The developed method could also be used without DMS add-on equipment. Nevertheless, the DMS-module showed a higher selectivity in the measurement series and the signal-to-noise ratio (S/N) improved by a factor of 3.5 compared to measurements without DMS.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis	XV
Abkürzungsverzeichnis	XIX
1. Einleitung	1
2. Theoretischer Hintergrund	3
2.1. Atmungskette und reaktive Sauerstoffspezies	3
2.2. Antioxidative Abwehr	4
2.3. Oxidativer Stress	4
2.4. Modell von oxidativem Stress durch Tauchen	6
2.5. Biochemie der Isoprostane	7
2.6. Analytik von Isoprostanen	17
2.7. Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS)	21
3. Zielsetzung	25
3.1. Hypothese 1	25
3.2. Hypothese 2	28
4. Material	29
4.1. Geräte	30
4.2. Lösungsmittel	30
4.3. Chemikalien	31
4.4. Verbrauchsmaterial	31
4.5. Referenzsubstanzen	32
4.6. Computerprogramme	34
5. Methoden	35
5.1. Ermittlung grundlegender Methodenparameter	35
5.2. Optimierung chromatographischer Parameter	37
5.3. Optimierung der Ionenquellenparameter	37
5.4. Optimierung der DMS-Parameter	38
5.5. Chromatographie unter sauren Bedingungen	39
5.6. DMS-Optimierung unter sauren Bedingungen	39
5.7. Optimierung der Festphasenextraktion (SPE)	40
5.8. Optimierung der Festphasen-unterstützten Flüssigextraktion (SLE)	46

5.9. Dilute & Shoot	48
5.10. Validierung	49
5.11. Bestimmung von IPG F _{2α} in Urinen von Tauchern vor und nach einem Tauchgang .	53
5.12. Bestimmung von 15(R)-IPG F _{2α} als potentieller alternativer Biomarker	54
5.13. Vergleich von IPG F _{2α} -Messungen mit und ohne DMS	54
6. Ergebnisse	55
6.1. Ermittlung grundlegender Methodenparameter	55
6.2. Optimierung chromatographischer Parameter	66
6.3. Optimierung der Ionenquellenparameter	67
6.4. Optimierung der DMS-Parameter	70
6.5. Chromatographie unter sauren Bedingungen	71
6.6. DMS-Optimierung unter sauren Bedingungen	72
6.7. Optimierung der Festphasenextraktion (SPE)	75
6.8. Optimierung der Festphasen-unterstützten Flüssigextraktion (SLE)	87
6.9. Dilute & Shoot	91
6.10. Validierung	95
6.11. Bestimmung von IPG F _{2α} in Urinen von Tauchern vor und nach einem Tauchgang .	112
6.12. Bestimmung von 15(R)-IPG F _{2α} als potentieller alternativer Biomarker	118
6.13. Vergleich von IPG F _{2α} -Messungen mit und ohne DMS	121
7. Diskussion	123
7.1. Hypothese 1	124
7.2. Hypothese 2	136
7.3. Ausblick	149
8. Zusammenfassung	157
A. Anhang: LC-DMS-MS/MS-Methoden	161
A.1. Tuning-Parameter	161
A.2. Methode 1 - generische Einstellungen	162
A.3. Methode 2 - alkalisches Fließmittel	163
A.4. Methode 3 - saures Fließmittel	165
A.5. Methode 4 - Dilute & Shoot	167
Literaturverzeichnis	169

Abbildungsverzeichnis

2.1. Bildung von ROS in der Atmungskette	3
2.2. Prooxidatives-Antioxidatives Gleichgewicht	5
2.3. Schema zur Bildung von F ₂ -Isoprostanen	8
2.4. Struktur, Benennung und Zählweise von Isoprostanen	9
2.5. Bildungsmechanismus der Isoprostane	10
2.6. Bildung des humanen Hauptmetaboliten von IPG F _{2α}	15
2.7. Metabolismus von IPG F _{2α}	16
2.8. Aufbau der DMS-Zelle des SelexION-Moduls	22
2.9. Darstellung der DMS-Phasen im SelexION-Modul	23
2.10. Funktionsweise der DMS-Zelle des SelexION-Moduls	24
6.1. charakteristische Hauptfragmente der vier Isoprostan-Regiomere	60
6.2. Einfluss von Fließmittel-Modifikatoren auf IPG F _{2α}	61
6.3. Einfluss des Aufnahmelösungsmittels nach Abdampfen auf IPG F _{2α}	62
6.4. Einfluss der DMS-Temperatur auf IPG F _{2α}	63
6.5. Veränderung der COV in Abhängigkeit von SV	64
6.6. Trennung der Epimere IPG F _{2α} und PG F _{2α} bei SV von 3000 V bzw. 4000 V	65
6.7. Trennung 15(R)-IPG F _{2α} und IPG F _{2α} bei 30 % FM B, 50 °C und 400 µL/min	66
6.8. Optimierung Curtain Gas (CUR)	67
6.9. Optimierung Ion Spray Voltage (IS)	68
6.10. Optimierung Nebulizer-Temperatur (TEM)	68
6.11. Optimierung Nebulizer Gas (GS1)	69
6.12. Optimierung Heater Gas (GS2)	69
6.13. Vergleich Quellenparameter vor und nach Optimierung	70
6.14. Trennung 15(R)-IPG F _{2α} und IPG F _{2α} bei 50 % FM B, 50 °C und 400 µL/min	71
6.15. Signalfläche IPG F _{2α} in Abhängigkeit von COV	72
6.16. relative DMS-Transmission der interferierenden Isomere in Abhängigkeit von COV	74
6.17. Wiederfindung IPG F _{2α} nach Evaporation mit und ohne Keepersubstanzen	76
6.18. Wiederfindung IPG F _{2α} nach Evaporation aus ammoniakalischer Lösung	77
6.19. Wiederfindung IPG F _{2α} mit unterschiedlichen SPE-Sorbentien	78
6.20. Waschoptimierung Plexa	80
6.21. Elutionsoptimierung Plexa	80
6.22. Optimierung Waschvolumen Plexa	81
6.23. Waschoptimierung Plexa PAX	82
6.24. Elutionsoptimierung Plexa PAX	83
6.25. Optimierung Waschvolumen Plexa PAX	83

6.26. SPE-Extraktionseffizienz von IPG F _{2α}	85
6.27. SPE-Methodeneffizienz von IPG F _{2α}	85
6.28. SPE-Matrixeffekt von IPG F _{2α} -D4	86
6.29. Wiederfindung IPG F _{2α} mit unterschiedlichen SLE-Lösungsmitteln	87
6.30. Elutionsoptimierung SLE	88
6.31. SLE-Extraktionseffizienz von IPG F _{2α}	89
6.32. SLE-Methodeneffizienz von IPG F _{2α}	90
6.33. SLE-Matrixeffekt von IPG F _{2α} -D4	90
6.34. Chromatogramm Direktinjektion Realurin (FM Methanol)	92
6.35. Chromatogramm Direktinjektion Realurin (FM Acetonitril)	92
6.36. Chromatogramm Direktinjektion Realurin (FM Acetonitril, Steigung 0,6 %/min)	93
6.37. Vergleich unterschiedlicher Injektionsvolumina	94
6.38. Stabilität von aufgearbeiteten Proben im Autosampler	95
6.39. Einfrier-/Auftau-Stabilität von Urinen	96
6.40. Auswirkung COV auf die Signalintensität von IPG F _{2α}	97
6.41. relative Transmission von IPG F _{2α} in Abhängigkeit von COV	98
6.42. relative Transmission von 15(R)-IPG F _{2α} in Abhängigkeit von COV	98
6.43. relative Transmission von IPG F _{2β} in Abhängigkeit von COV	99
6.44. relative Transmission von 11β-PG F _{2α} in Abhängigkeit von COV	99
6.45. Selektivität am Beispiel von Urin Nr. 2	101
6.46. Selektivität am Beispiel von Urin Nr. 16	101
6.47. Selektivität am Beispiel von Urin Nr. 20	102
6.48. Linearität von IPG F _{2α} in Surine incl. Residuen	103
6.49. Linearität von IPG F _{2α} in Urin incl. Residuen	103
6.50. Matrixvergleich mittels ANOVA	105
6.51. Verschleppungsprüfung Urin Nr. 2 (Creatinin 137 mg/L)	110
6.52. Verschleppungsprüfung Mixurin (Creatinin 4302 mg/L)	111
6.53. Verteilung der Creatininkonzentrationen	112
6.54. Vergleich der Creatininkonzentrationen mittels ANOVA	113
6.55. Verteilung der IPG F _{2α} -Messwerte	115
6.56. Vergleich absolute IPG F _{2α} -Konzentrationen mittels ANOVA	115
6.57. Vergleich normierte IPG F _{2α} -Konzentrationen mittels ANOVA	116
6.58. Korrelation IPG F _{2α} -Veränderung mit Sauerstofflast	117
6.59. Verteilung der 15(R)-IPG F _{2α} -Messwerte	118
6.60. Vergleich absolute 15(R)-IPG F _{2α} -Konzentrationen mittels ANOVA	119
6.61. Vergleich normierte 15(R)-IPG F _{2α} -Konzentrationen mittels ANOVA	119
6.62. Korrelation 15(R)-IPG F _{2α} -Veränderung mit Sauerstofflast	121
6.63. Methodenvergleich mit und ohne DMS	121
6.64. Vergleich der IPG F _{2α} -Messungen mit und ohne DMS	122
7.1. 3D-Darstellung von IPG F _{2α} und PG F _{2α}	136
7.2. Lage der COV-Optima aller Referenzsubstanzen	137
7.3. Lage der COV-Optima der potentiell interferierenden Isomere	138

7.4. Verschiebung der COV zur Steigerung der Selektivität	139
7.5. Selektivität mit und ohne DMS am Beispiel einer Standard-Mischung	140
7.6. Selektivität mit und ohne DMS am Beispiel von Urin Nr. 20 (undotiert)	140
7.7. Selektivität mit und ohne DMS am Beispiel von Urin Nr. 20 (dotiert)	141
7.8. Reduktion der Signalanzahl durch die Selektivitätskomponenten	142
7.9. Strukturformeln der Enantiomere IPG F _{2α} und ent-IPG F _{2α}	143
7.10. Vergleich von Messungen mit und ohne DMS: Störung des IS	144
7.11. Vergleich von Taucherurin Nr. 20 mit und ohne DMS	145
7.12. Vergleich von Taucherurin Nr. 22 mit und ohne DMS	146
7.13. Vergleich von Taucherurin Nr. 138 mit und ohne DMS	147
7.14. Sauerstoffabhängigkeit der Isoprostanbildung	155

Tabellenverzeichnis

2.1. physiko-chemische Eigenschaften von IPG F _{2α}	12
2.2. Referenzbereiche von IPG F _{2α} in Urin	14
2.3. Beispiele für GC-Methoden aus der Matrix Urin	20
2.4. Beispiele für LC-Methoden aus der Matrix Urin	21
4.1. Bezugsquellen von Chemikalien, Geräten und Verbrauchsmaterialien	29
4.2. allgemeine Laborgeräte	30
4.3. analytische Systeme	30
4.4. Lösungsmittel	30
4.5. Chemikalien	31
4.6. Verbrauchsmaterial	31
4.7. Daten der Referenzsubstanzen	32
4.8. Strukturformeln der Referenzsubstanzen	32
4.9. verwendete Computerprogramme	34
5.1. Optimierung der initialen DMS-Parameter	36
5.2. Optimierung der Chromatographie (isokratisch, alkalisch)	37
5.3. Optimierung der Quellenparameter	37
5.4. COV-Mapping (alkalisch)	38
5.5. DMS-Mapping (alkalisch)	38
5.6. Optimierung der Chromatographie (isokratisch, sauer)	39
5.7. COV-Mapping (sauer)	39
5.8. DMS-Mapping (sauer)	40
5.9. Test des Evaporationsverhaltens (angesäuert)	40
5.10. Protokolle SPE-Sorbentiencreening	41
5.11. SPE-Protokoll Waschoptimierung Sorbens Plexa	42
5.12. SPE-Protokoll Optimierung der Elution Sorbens Plexa	42
5.13. SPE-Protokoll Optimierung des Waschvolumens Sorbens Plexa	43
5.14. SPE-Protokoll Waschoptimierung Sorbens Plexa PAX	44
5.15. SPE-Protokoll Optimierung der Elution Sorbens Plexa PAX	44
5.16. SPE-Protokoll Optimierung des Waschvolumens Sorbens Plexa PAX	45
5.17. SLE-Protokoll des Lösungsmittelscreenings	46
5.18. SLE-Protokoll Optimierung Elutionsvolumen	47
5.19. Prüfung der pH-Einstellung von Urin	47
5.20. Modifikationen der Methode (Dilute & Shoot)	48
5.21. Prüfung des maximalen Injektionsvolumens	49

5.22. Variablen zur Validierung der Selektivität des DMS-Moduls	50
5.23. Creatininkonzentrationen der zur Validierung verwendeten Urinproben	51
6.1. Produktionenscans der verwendeten Referenzsubstanzen	55
6.2. Ergebnisse der Ermittlung der COV von IPG $F_{2\alpha}$ und PG $F_{2\alpha}$	64
6.3. COV-Werte aller Referenzsubstanzen bei SV 4000 V	65
6.4. optimierte Ionenquellenparameter	69
6.5. Retentionsdaten (saures FM)	73
6.6. Ermittlung Transmission durch das DMS-Modul	75
6.7. Eigenschaften der getesteten SPE-Sorbentien	77
6.8. Protokoll der optimierten Methode Plexa	81
6.9. Protokolle der optimierten Methoden Plexa PAX	84
6.10. Einfluss von Säuremodifikatoren auf pH-Wert eines Realurins	88
6.11. Protokoll der optimierten SLE-Methode	89
6.12. Auswirkung des Injektionsvolumens auf die Peakbreite	94
6.13. Retentionsdaten (Dilute & Shoot)	97
6.14. Validierung der DMS-Transmission	100
6.15. endogene IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen Matrixvergleich	104
6.16. Konzentrationen Kalibratoren Matrixvergleichs	104
6.17. Vergleich von Steigungen der Regressionsgeraden	105
6.18. Validierungsdaten Präzision und Richtigkeit	106
6.19. Validierungsdaten Matrixeffekt	108
6.20. endogene IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen Grenzwertbestimmung	108
6.21. Konzentrationen Kalibratoren Grenzwertbestimmung	109
6.22. Validierungsdaten Grenzwertbestimmung	109
6.23. Zusammenfassung Daten Creatininverteilung	113
6.24. Ergebnisse Qualitätskontrollen	114
6.25. Veränderung der normierten IPG $F_{2\alpha}$ -Werte	116
6.26. Klassifizierung Tauchgänge über IPG $F_{2\alpha}$ pro Creatinin	117
6.27. Veränderung der normierten 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Werte	120
6.28. Klassifizierung Tauchgänge über 15(R)- IPG $F_{2\alpha}$ pro Creatinin	120
7.1. Veränderung von IPG $F_{2\alpha}$ und 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ nach einem Tauchgang	132
7.2. Klassifizierung von IPG $F_{2\alpha}$ und 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ nach einem Tauchgang	132
7.3. Kenndaten der Urine des Vergleichs der Messungen mit und ohne DMS-Modul . . .	145
7.4. Ergebnisse Vergleich mit und ohne DMS	147
7.5. Literaturvergleich zu IPG $F_{2\alpha}$ -Messungen (Urin)	150
7.6. Beispiele für Marker des oxidativen Stresses (Urin)	151
7.7. Literaturvergleich zu anderen Markern des oxidativen Stresses (Urin)	152
7.8. Vergleich der Marker IPG $F_{2\alpha}$ und 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ mit DHB	153
A.1. Tuning-Parameter	161
A.2. LC-MS/MS Parameter Methode 1	162
A.3. LC-MS/MS Parameter Methode 2	163

A.3. LC-MS/MS Parameter Methode 2	164
A.4. LC-MS/MS Parameter Methode 3	165
A.4. LC-MS/MS Parameter Methode 3	166
A.5. LC-MS/MS Parameter Methode 4	167
A.5. LC-MS/MS Parameter Methode 4	168

Abkürzungsverzeichnis

8-OH-dG	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin
ACN	Acetonitril
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ATP	Adenosintriphosphat
BG	Bestimmungsgrenze
CAS	chemical abstracts service
CE	Kollisionsenergie
COV	Kompensationsspannung
cps	Zähleinheiten pro Sekunde
CUR	Curtain Gas
CXP	Cell Exit Potential
DHB	dihydroxylierte Benzoate
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMO	DMS-Offset
DMS	Differentielle Mobilitätsspektrometrie
DMSoff	DMS-Modul ausgeschaltet
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Declustering Potential
DT	DMS-Temperatur
EA	Ethylacetat
EFSA	European Food Safety Authority
EI	Elektronenstoßionisation
EIA	Enzym-Immunoassay
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
ESI	Elektrospray-Ionisation
FA	Ameisensäure
FAIMS	High Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry
FDA	Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittelsicherheit der USA
GC	Gaschromatographie

GS1	Nebulizer Gas
GS2	Heater Gas
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
HBO	hyperbare Sauerstofftherapie
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie
IA	Ionenaustausch
IAC	Immunoaffinitätskartuschen
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IPG	Isoprostaglandin
IS	Ion Spray Voltage
IS	interner Standard
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
k. A.	keine Angaben
LC	Flüssigchromatographie
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion
m/z	Massenzahl, Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MDA	Malondialdehyd
MeOH	Methanol
MM	Mixed-Mode
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NCI	negative chemische Ionisierung
NG	Nachweisgrenze
NH ₃	Ammoniak, Ammoniaklösung
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
PG	Prostaglandin
PPT	Proteinfällung
PS/DVB	Polystyrol/Divinylbenzol
psi	pounds per square inch

RCF	relative Zentrifugalkraft
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP	Umkehrphase
s	Standardabweichung
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
SANTE	Generaldirektion Gesundheit und Lebensmittelsicherheit der EU
SAX	starker Anionentauscher
SLE	supported liquid extraction
SPE	Festphasenextraktion
SV	Trennspannung
tBME	tertiär-Butylmethylether
TEM	Temperature
TLC	Dünnschichtchromatographie
UHPLC	Ultra High Pressure Liquid Chromatography
VK	Variationskoeffizient

1. Einleitung

Alle aeroben Organismen unterliegen einem grundlegenden biologischen Paradoxon: Einerseits wird Sauerstoff in den Mitochondrien zur Energieerzeugung über die Atmungskette (ATP-Bildung) zwingend benötigt, wobei teils hochreaktive Zwischenprodukte (reaktive Sauerstoffspezies) gebildet werden. Andererseits muss eine ungewollte Schädigung von Biomolekülen (z. B. DNA, RNA, Proteine und Lipide) oder Zellstrukturen durch die dabei entstehenden extrem reaktiven Agentien verhindert werden. Somit sind alle Aerobier dem Phänomen potentieller oxidativer Schädigungen ausgesetzt. Übersteigt die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies die Kapazität der körpereigenen antioxidativen Abwehr, bezeichnet man diesen Zustand als oxidativen Stress (s. unter 2.3 auf Seite 4).

Die Bestimmung von Biomarkern zum Nachweis von oxidativem Stress *in vivo* stellt eine analytische Herausforderung dar (s. unter 2.6 auf Seite 17). Akute bzw. kurzfristige Veränderungen von geeigneten Markern nach einer oxidativen Belastung sind derzeit quantitativ schwer verfolgbar und daher nur wenig untersucht. Ein geeignetes Modell zur Erzeugung von oxidativem Stress *in vivo* stellt das Tauchen mit reinem Sauerstoff dar (s. unter 2.4 auf Seite 6). In der verfügbaren Literatur finden sich hierzu zwar nur wenige Artikel, die aber erfolgreich oxidativen Stress mit Hilfe dieses Modells und der quantitativen Messung dihydroxylierter Benzoate als Biomarker nachgewiesen haben [1, 2].

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von oxidativem Stress *in vivo* ist die Messung der aus Arachidonsäure gebildeten Isoprostane. Die Lipide von Zellmembranen - mengenmäßig vorwiegend Arachidonsäure - sind aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens wahrscheinliche Ziele eines Angriffs durch reaktive Sauerstoffspezies. Der Metabolismus von Arachidonsäure galt als enzymatisch geprägt, bis Morrow und Roberts 1990 [3] einen alternativen Stoffwechselweg über freie Radikale beschrieben. Dieser führte zu der neuen Substanzklasse der Isoprostane [4]. Das Isomer IPG $F_{2\alpha}$ hat sich dabei als nahezu idealer Biomarker zur Bestimmung von oxidativem Stress *in vivo* herausgestellt (s. unter 2.3 auf Seite 4).

Ziel dieser Arbeit war es, an dem Realmodell von oxidativem Stress durch Tauchen mit reinem Sauerstoff die Veränderungen vor und nach einem Tauchgang anhand des Markers IPG $F_{2\alpha}$ quantitativ zu verfolgen (s. unter 3 auf Seite 25). Dazu war es nötig ein selektives Analysenverfahren zur Bestimmung von IPG $F_{2\alpha}$ aus der Matrix Urin zu entwickeln, zu validieren und bei Proben von Tauchern vor und nach einer hyperbar-hyperoxischen Belastung anzuwenden. Akute Veränderungen von IPG $F_{2\alpha}$ durch einen Tauchgang sind in der verfügbaren Literatur bisher nicht ausreichend untersucht und quantifiziert worden. Anhand der Ergebnisse war zu klären, ob Tauchen zu einem messbaren Anstieg des Markers IPG $F_{2\alpha}$ führen kann. Dieses wäre ein Hinweis auf ein erhöhtes Niveau an oxidativem Stress während des Tauchvorgangs, welches man möglicherweise durch eine entsprechende Ernährung - beispielsweise eine antioxidantienreiche Kost - reduzieren kann.

2. Theoretischer Hintergrund

Aerobe Spezies verwenden Sauerstoff zur effizienten Energieerzeugung. Bei diesem Vorgang werden im aeroben Zellmetabolismus hochreaktive Zwischenprodukte gebildet. Der Organismus schützt sich vor den dabei entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies durch antioxidative Abwehrmechanismen. Im Spannungsfeld zwischen Energieerzeugung auf der einen und Toxizität der dabei entstehenden Nebenprodukte auf der anderen Seite kann es zum Zustand des oxidativen Stresses kommen.

2.1. Atmungskette und reaktive Sauerstoffspezies

Im aeroben Zellmetabolismus generiert der Körper über die Atmungskette Energieäquivalente in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Dabei wird molekularer Sauerstoff in den Mitochondrien zu Wasser reduziert. Die bei diesen Reaktionen freiwerdende Energie wird in den Phosphatbindungen des ATP gespeichert. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser im Komplex IV der Atmungskette. Diese Reaktion ist in vier elektronenübertragende Schritte unterteilt (s. Abb. 2.1). Kommt es hierbei zu Unterbrechungen, dann können reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt werden. [5–8]

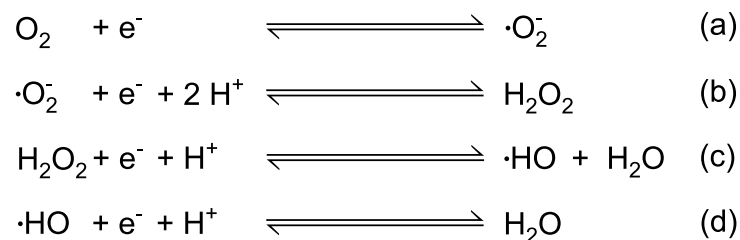


Abb. 2.1.: Darstellung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in der Atmungskette (Abb. in Anlehnung an [6]). Molekularer Sauerstoff wird durch Elektronenübertragung nacheinander zum Superoxidanion-Radikal (a), Wasserstoffperoxid (b), Hydroxylradikal (c) und Wasser (d) reduziert.

Untersuchungen in diesem Zusammenhang haben gezeigt, dass etwa 1-3 % des metabolisierten Sauerstoffs in reaktive Sauerstoffspezies umgesetzt werden [9], nach anderen Quellen [10] werden etwa 5 % als ROS freigesetzt. Die so unter physiologischen Bedingungen gebildeten reaktiven Zwischenprodukte werden größtenteils durch mitochondriale Abwehrmechanismen kontrolliert verstoffwechselt, so dass kein relevanter Schaden entsteht [5].

Bei körperlicher Belastung steigt der ATP-Verbrauch des Organismus. Zur Deckung des benötigten Energiebedarfs wird in der Atmungskette mehr Sauerstoff umgesetzt, was eine verstärkte Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies zur Folge hat.

Zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehören u. a. das Superoxidanion-Radikal ($\cdot\text{O}_2^-$) und das Perhydroxylradikal ($\cdot\text{HO}_2$) als dessen protonierte Form, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das besonders reaktive Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$). Viele dieser Verbindungen sind hochreaktiv und instabil. Sie existieren nur für Milli- oder Nanosekunden bevor eine Kettenreaktion ausgelöst und diese Reaktivität weitergegeben wird [11].

Etwa 10 % der zellulären reaktiven Sauerstoffspezies werden gezielt endogen erzeugt z. B. in Makrophagen im Rahmen der Immunabwehr des Körpers [11]. Weiterhin gibt es eine Reihe exogener Quellen für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, u. a. Photolyse durch ultraviolettes Licht, ionisierende Strahlung, Ozon, pharmakologische Wirkstoffe, Rauchen, Alkohol, Pestizide und Mykotoxine [12].

2.2. Antioxidative Abwehr

Da reaktive Sauerstoffspezies (Prooxidantien) ein natürlicher Bestandteil des aeroben Lebens sind, entwickelten aerobe Organismen verschiedene Mechanismen zum Schutz davor. Diese werden gemäß der Literatur in ein körpereigenes Abwehrsystem und in nicht-enzymatische antioxidative Komponenten unterteilt [13].

Das körpereigene Abwehrsystem besteht hauptsächlich aus Enzymen wie Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase. Neben der Superoxiddismutase, welche eine Disproportionierung von zwei Molekülen Superoxid zu Sauerstoff und Peroxid bewirkt, wurde kürzlich das Enzym Superoxidoxidase beschrieben, welches Superoxid direkt zu Sauerstoff oxidieren kann [14].

Unter dem Begriff Antioxidantien werden im Gegensatz dazu alle nicht körpereigenen Substanzen zusammengefasst, die bei Anwesenheit in geringer Konzentration im Vergleich zum oxidierbaren Substrat eine Oxidation dieses Substrats signifikant verzögern oder verhindern [15]. Diese Definition wurde später dahingehend erweitert, dass ein Antioxidans jede Substanz ist, die oxidativen Schaden an einem Zielmolekül verzögert, verhindert oder entfernt [16].

Als Antioxidantien gelten daher natürliche oder synthetische Moleküle, welche die exzessive Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies oder deren Reaktionen mit biologischen Strukturen oder Molekülen verhindern. Zu ihnen gehören beispielsweise mit der Nahrung aufgenommene Tocopherole, Carotine, Ascorbate, Ubichinone und Flavonoide. [17]

2.3. Oxidativer Stress

Wird das antioxidative System des Körpers durch ein zu hohes Aufkommen reaktiver Sauerstoffspezies überfordert, kommt es zu oxidativem Stress.

Der Begriff „oxidativer Stress“ wurde 1985 von Helmut Sies [18] als *a disturbance in the prooxidant-antioxidant balance in favour of the former* definiert und als Titel eines von ihm editierten Buches verwendet. Wie bereits beschrieben werden Oxidantien als übliche Produkte des aeroben Metabolismus in der Form von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gebildet. Sie können beispielsweise unter pathophysiologischen Konditionen verstärkt produziert werden. Das Gleichgewicht zwischen Bildung und Neutralisierung von reaktiven Sauerstoffspezies wird durch ein komplexes Netz antioxidativer Abwehr gewährleistet, welches sich teilweise an die wechselnden Bedürfnisse anpassen kann. [19]

Oxidativer Stress resultiert aus einem gestörten Gleichgewicht zwischen Pro- und Antioxidantien (s. Abb. 2.2 auf der nächsten Seite). Die verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies oder eine verminderte antioxidative Abwehr des Körpers kann Schäden an Biomolekülen wie DNA, Proteinen, oder Membranlipiden verursachen. Diese Auswirkungen können als Biomarker gemessen und als Indikatoren für oxidativen Stress verwendet werden. Bei zu umfangreichen Schäden an zellulären Makromolekülen kann es zu Unterbrechungen der Signaltransduktion und damit zum Ausfall der normalen Zellfunktionen kommen. So können beispielsweise die durch freie Radikale oxidierten Lipide spontan die Fluidität der Zellmembranen verändern und dadurch eine Inaktivierung von membranabhängigen Enzymen und membrangebundenen Rezeptoren auslösen [20].

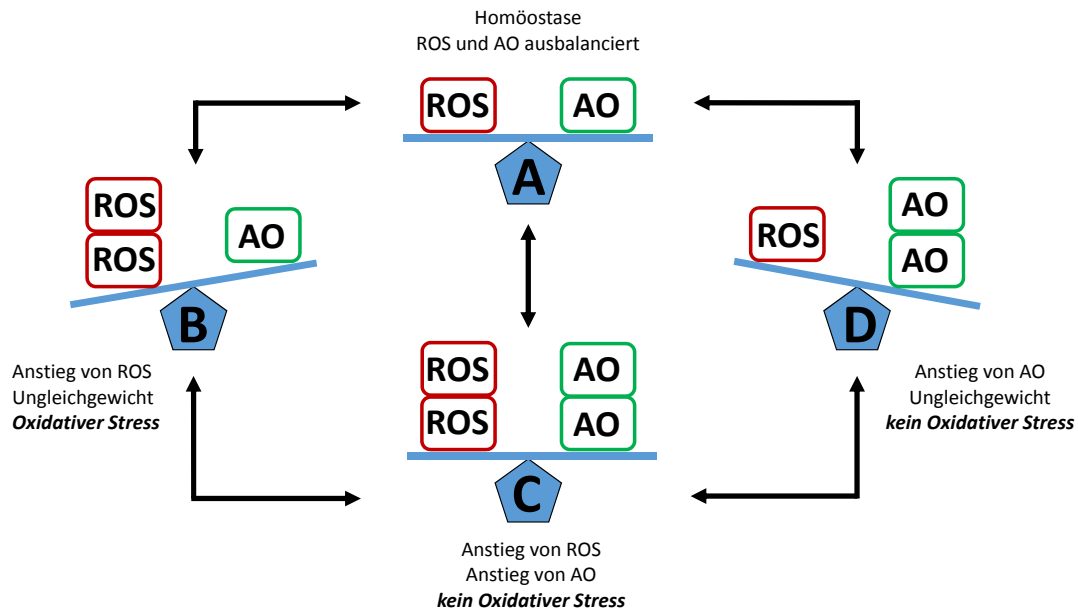


Abb. 2.2.: Darstellung des Gleichgewichts zwischen Prooxidantien und Antioxidantien (Abb. in Anlehnung an [11]). In der Homöostase (A) liegen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Antioxidantien (AO) ausbalanciert vor. Eine verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (B) kann das Gleichgewicht verändern und zu oxidativem Stress führen. Eine Verstärkung der antioxidativen Abwehr (C) kann einen Ausgleich wieder herstellen. Ein alleiniger Anstieg der Antioxidantien bewirkt zwar ein Ungleichgewicht (D), aber keinen oxidativen Stress.

Sies [21] erweiterte seine ursprüngliche Definition einige Jahre später zu *a disturbance in the prooxidant-antioxidant balance in favour of the former, leading to potential damage*, um die potentiell schädlichen Produkte als Indikatoren für oxidativen Stress einzubeziehen.

Oxidativer Stress wird mit einer Vielzahl von Krankheitsbildern wie beispielsweise Alzheimer, Arteriosklerose, Arthritis, Asthma, Demenz, Diabetes, Entzündungen, Ischämie, Krebs, Multiple Sklerose, Parkinson und sogar dem natürlichen Alterungsprozess in Verbindung gebracht [20, 22–26]. Da es nur wenige zuverlässige *in vivo*-Messmethoden für Marker des oxidativen Stresses gibt, ist über dessen Rolle bei diversen Krankheiten nur wenig bekannt [27]. Bereits 1989 - ein Jahr vor der Erstbeschreibung der Isoprostane - schrieb William Pryor: *one of the greatest needs in this field now is the availability of non-invasive tests to probe oxidative stress status in humans* [28].

Die Analytik von oxidativem Stress ist herausfordernd, da es sich bei den eigentlichen Agentien um reaktive Sauerstoffspezies handelt (s. unter 2.1 auf Seite 3). Diese sind teilweise äußerst reaktiv und haben dadurch bedingt oft sehr kurze Halbwertszeiten. Sie können daher nicht aus einer biologischen Matrix isoliert oder direkt gemessen werden. Die Reaktionen mit Biomolekülen wie beispielsweise Membranlipiden führt zu stabileren Produkten, die sich dann als Kenngröße zur Bestimmung von oxidativem Stress eignen. [17]

Die Anzahl der in der Literatur verwendeten Biomarker zum Thema oxidativer Stress ist groß und unübersichtlich. Giustarini et al. [17] berichten von über 71 unterschiedlichen Biomarkern des oxidativen Stresses, welche in Untersuchungen aus nur dem ersten Halbjahr 2006 verwendet wurden. Zur Messung des oxidativen Stresses *in vitro* stehen beispielsweise eine ganze Reihe diverser Lipidperoxidationsprodukte zur Verfügung, als problematisch gelten aber vor allem Messungen von Biomarkern *in vivo* [29].

Mit der Klasse der F₂-Isoprostane (s. unter 2.5 auf der nächsten Seite) und speziell dem Isomer IPG F_{2α} wurde ein Biomarker des oxidativen Stresses beschrieben, welcher eine nicht-invasive Beurteilung der endogenen Lipidperoxidation zuverlässig ermöglicht und aktuell als Goldstandard der Bestimmung von oxidativem Stress *in vivo* gilt.

2.4. Modell von oxidativem Stress durch Tauchen

Unter Normaldruck werden die körpereigenen Zellen durch Hämoglobin mit Sauerstoff versorgt. Hämoglobin besitzt vier Eisen-II-Komplexe, die unter Normalbedingungen nach dem Passieren der Lunge jeweils mit einem Sauerstoffmolekül belegt sind. Somit werden von einem Hämoglobin-Proteinkomplex vier Sauerstoffmoleküle transportiert, wobei etwa 99 % des Hämoglobins nach der Lungenpassage mit Sauerstoff beladen ist. [30, 31]

Zusätzlich sind im Blutplasma unter physiologischen Bedingungen (21 % Sauerstoff in der Umgebungsluft und Normaldruck) etwa 3 mL Sauerstoff in einem Liter Plasma gelöst. Unter diesen Bedingungen wird der Körper ausschließlich mit dem durch Hämoglobin transportierten Sauerstoff versorgt, der gelöste Sauerstoff spielt hierbei keine Rolle. [31, 32]

Unter hyperbar-hyperoxischen Bedingungen, wie sie beim Tauchen mit komprimierten Gasen vorliegen, erhöht sich nach dem Henry-Gesetz [31, 32] die Menge des gelösten Sauerstoffs:

$$\text{Konzentration (c)} = \text{Löslichkeitsprodukt (a)} \times \text{Druck (p)}$$

Unter diesen Bedingungen liegt mehr Sauerstoff in jeder Zelle des Körpers in gelöster Form vor [8]. Unter Normaldruck kommt es in den Mitochondrien durch Reaktionsabbrüche im Komplex IV der Atmungskette zu einer Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (s. unter 2.1 auf Seite 3). Im Gegensatz dazu liegt unter hyperbar-hyperoxischen Bedingungen aufgrund der höheren Konzentration an gelösten Gasen im Plasma eine höhere Sauerstoffdichte an den Mitochondrien vor. Diese führt zu zusätzlichen direkten Elektronenübertragungen auf Sauerstoff am Komplex II und III der Atmungskette, wodurch verstärkt reaktive Sauerstoffspezies entstehen [5, 6, 8, 33]. Versuche von Boveris [33] und Turrens [7, 8, 34] haben gezeigt, dass sowohl die Bildung des Superoxidanionradikals als auch von Wasserstoffperoxid linear zum Sauerstoffpartialdruck ansteigt. Die so unter unphysiologischen Bedingungen entstehenden Mengen von reaktiven Sauerstoffspezies können nur teilweise durch die mitochondrialen Abwehrmechanismen abgefangen und entgiftet werden. Es kann dadurch zu einer Bildung und Anreicherung toxischer Verbindungen wie z. B. Peroxidationsprodukte ungesättigter Fettsäuren kommen. [5, 6]

Aufgrund der hyperbar-hyperoxischen Bedingungen ist Tauchen ein bewährtes und nahezu ideales Modell zur Untersuchung von oxidativem Stress. Taucher verwenden Sauerstoff unter Überdruck und verrichten bei Schwimmübungen unter Wasser anstrengende körperliche Aktivitäten. Im Gegensatz zu beispielsweise anderen Sportarten unterliegen Taucher damit einer doppelten Belastung: Einerseits liegt aufgrund der hyperbar-hyperoxischen Bedingungen mehr Sauerstoff im Körper zur Verwertung vor, andererseits wird durch körperliche Belastung der aerobe Metabolismus gesteigert (s. unter 2.1 auf Seite 3). Beides führt zu einer verstärkten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies.

Da die verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies über zwei unterschiedliche Wege erfolgt, kann Tauchen mit reinem Sauerstoff ideal als Modell zur Untersuchung von oxidativem Stress verwendet werden. Proben können dabei wie in der vorliegenden Arbeit bei echten Tauchgängen gewonnen werden. Bei diesem Ansatz handelt es sich um das Humanmodell einer hyperbaren Oxygenierung mit einer körperlichen Belastung zur Erzeugung von oxidativem Stress unter den Realbedingungen eines Tauchgangs.

In der verfügbaren Literatur finden sich nur wenige Artikel über die quantitative Bestimmung von Biomarkern des oxidativen Stresses bei Tauchern, obwohl dieses Realmodell potentiell einen

hohen oxidativen Stress verursachen kann. Insbesondere akute bzw. kurzfristige Veränderungen von geeigneten Markern nach einer oxidativen Belastung durch einen Tauchgang sind bisher nur wenig untersucht.

Oxidativer Stress wird üblicherweise an kranken Probanden, in Tiermodellen oder *in vitro* gemessen. Es gibt keine in der Literatur beschriebenen Humanmodelle, bei denen gesunde Probanden bewusst einem hohen oxidativen Stress ausgesetzt werden. Die Verwendung von beispielsweise starken Medikamenten zur Erzeugung von oxidativem Stress oder Agentien zur Entkopplung der Atmungskette bei gesunden Probanden würde zu ethischen Konflikten führen. Daher werden entsprechende Untersuchungen oft an Personen durchgeführt, die aufgrund von Krankheiten oder beispielsweise Rauchen einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt sind. Das Modell des oxidativen Stresses durch Tauchen verwendet unphysiologische aber nicht pathologische Bedingungen und ist in dieser Hinsicht unkritisch und einzigartig zur Untersuchung von Parametern des oxidativen Stresses *in vivo*.

Als Modell einer körperlichen Belastung wurden vor allem an Sportlern Untersuchungen durchgeführt, hier fehlt aber die hyperbar-hyperoxische Komponente. Ab 1978 gibt es erste Berichte mit der Vermutung, Sport könne durch freie Radikale und Lipidperoxidation zu Gewebeschäden führen [35]. Verschiedene Autoren kommen zu ähnlichen Schlüssen, Training führt kurzfristig zu einem Anstieg von entsprechenden Biomarkern des oxidativen Stresses, es gibt aber Hinweise auf eine langfristige Senkung der Werte als Effekt des ausdauernden Trainings [23, 36–38].

Speziell Tauchern wird zur Vorbeugung gegen Lipidperoxidation und oxidativen Stress eine ausgewogene Ernährung mit hohem Anteil von Antioxidantien wie den Vitaminen C und E sowie den Spurenelementen Selen und Zink empfohlen [39]. Auch wird Benzoesäure in dieser Hinsicht als Nahrungsbestandteil mit Radikalfängerwirkung beschrieben [1, 2].

2.5. Biochemie der Isoprostane

Lipide sind essentielle Komponenten von Zellmembranen. Enthalten sie polyungesättigte Fettsäuren wie z. B. Arachidonsäure, sind diese Lipide aufgrund der Doppelbindungen ein Primärziel für den Angriff reaktiver Sauerstoffspezies und freier Radikale [40].

Arachidonsäure (Eicosatetraensäure) ist eine vierfach ungesättigte Fettsäure mit einem Grundgerüst aus 20 (gr. eicos) Kohlenstoffatomen. Sie ist eine in Zellmembranen von Säugetieren ubiquitär [41, 42] und die mengenmäßig damit am meisten vorkommende ungesättigte Fettsäure [4]. Der größte Teil der im Körper vorkommenden Arachidonsäure liegt nicht in freier Form, sondern mit Phospholipiden verestert vor [43, 44]. Aus ihr können enzymatisch über die Arachidonsäurekaskade verschiedene Eicosanoide gebildet werden wie z. B. Prostaglandine [45], bei welchen es sich um potente Lipidmediatoren des menschlichen Organismus handelt. Dabei wird aus freier Arachidonsäure zunächst mit Hilfe des Enzyms Cyclooxygenase ein reaktives Intermediat gebildet, welches dann enzymatisch durch Prostaglandinsynthasen zu den jeweiligen Prostaglandinen umgesetzt wird. [46]

Isoprostane - eine Verkürzung des Begriffs Iso-Prostaglandine - sind Prostaglandin-ähnliche Substanzen, welche nicht-enzymatisch in einer durch freie Radikale katalysierten Peroxidation der zellmembrangebundenen Arachidonsäure entstehen [47, 48] (s. Abb. 2.3 auf der nächsten Seite). Die so gebildeten und noch mit Phospholipiden veresterten Isoprostane werden anschließend durch Enzyme freigesetzt [17].

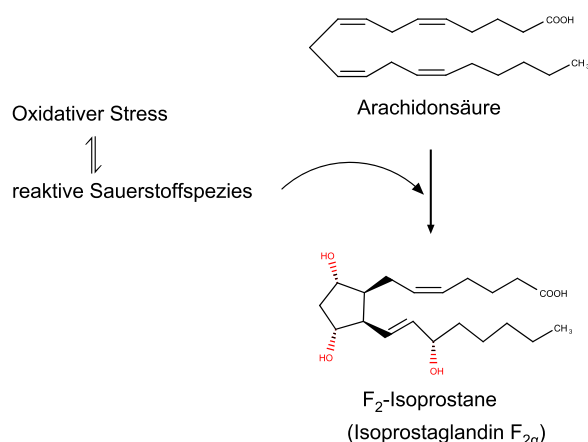


Abb. 2.3.: Schema zur Bildung von F₂-Isoprostanen (Abb. in Anlehnung an [28]); aus im Körper ubiquitär vorkommender Arachidonsäure werden durch nicht-enzymatische oxidative Vorgänge F₂-Isoprostane wie z. B. Isoprostaglandin F_{2α} gebildet.

Isoprostane sind Prostaglandin-Isomere und unterscheiden sich vorwiegend in der räumlichen Ausrichtung eines Substituenten (s. unter 2.5.4 auf Seite 11). Die Bedeutung der Isoprostanbildung *in vivo* wurde erst 1990 erkannt und führte zu neuen Methoden der Bestimmung von oxidativem Stress über Lipidperoxidationsprodukte [28]. Isoprostane gelten derzeit als zuverlässigste analytische Möglichkeit zur Bestimmung des oxidativen Stresses *in vivo*. [3, 49–52].

2.5.1. Entdeckung der Isoprostane

Seit mindestens 1967 gibt es Berichte über eine nicht-enzymatische *in vitro*-Bildung Prostaglandin-ähnlicher Autoxidationsprodukte aus ungesättigten Fettsäuren [53]. Dieses war ein typisches Laborproblem bei der Gefrierlagerung von arachidonsäurehaltigen Proben [28]. Erst über 20 Jahre später wurde die Möglichkeit einer *in vivo*-Bildung und die daraus resultierende analytische Bedeutung erkannt. Morrow et al. [3, 22, 47, 54] beschrieben 1990 zum ersten Mal einen Mechanismus für die durch freie Radikale katalysierte und Enzym-unabhängige Bildung neuartiger F₂-Prostaglandinisomere *in vivo*, und es erfolgt die Quantifizierung von F₂-Isoprostanen als Marker des oxidativen Stresses [47]. Die gleiche Arbeitsgruppe bewies 1992 die *in situ*-Bildung von Isoprostanen aus mit Phospholipiden veresterter Arachidonsäure [43]. Im Jahr 1992 wurde die neue Substanzklasse erstmalig als Isoprostane benannt [43], in 1993 folgte die Identifikation von Isoprostan-Metaboliten in Humanurin und Plasma [55].

2.5.2. Nomenklatur der Isoprostane

Derzeit werden in der Literatur drei unterschiedliche Nomenklatorsysteme [54, 56, 57] für Isoprostane parallel verwendet, was aufgrund der großen Anzahl von Substanzen und Isomeren problematisch werden kann [4]. Obwohl die IUPAC das Nomenklatorsystem nach Taber [57] empfohlen hat [4], konnte sich in der Praxis bisher keine der unterschiedlichen Benennungen durchsetzen. Da die Mehrzahl der Veröffentlichungen mit der ursprünglichen von den Prostaglandinen abgeleiteten Nomenklatur arbeitet, wird diese auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Isoprostane werden dabei analog zu Prostaglandinen nach dem enthaltenen Prostanringtypus benannt (s. Abb. 2.4 auf der nächsten Seite) [48]. Die Zählweise entspricht jener bei den Prostaglandinen und beginnt mit dem Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe. Viele Angaben beziehen sich auf Änderungen zur Bezugsverbindung Prostaglandin F_{2α}, beispielsweise wird durch die Änderung der Ausrichtung

an Position 8 aus Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (= PG $F_{2\alpha}$) das Isomer 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (= IPG $F_{2\alpha}$) (s. Abb. 2.4).

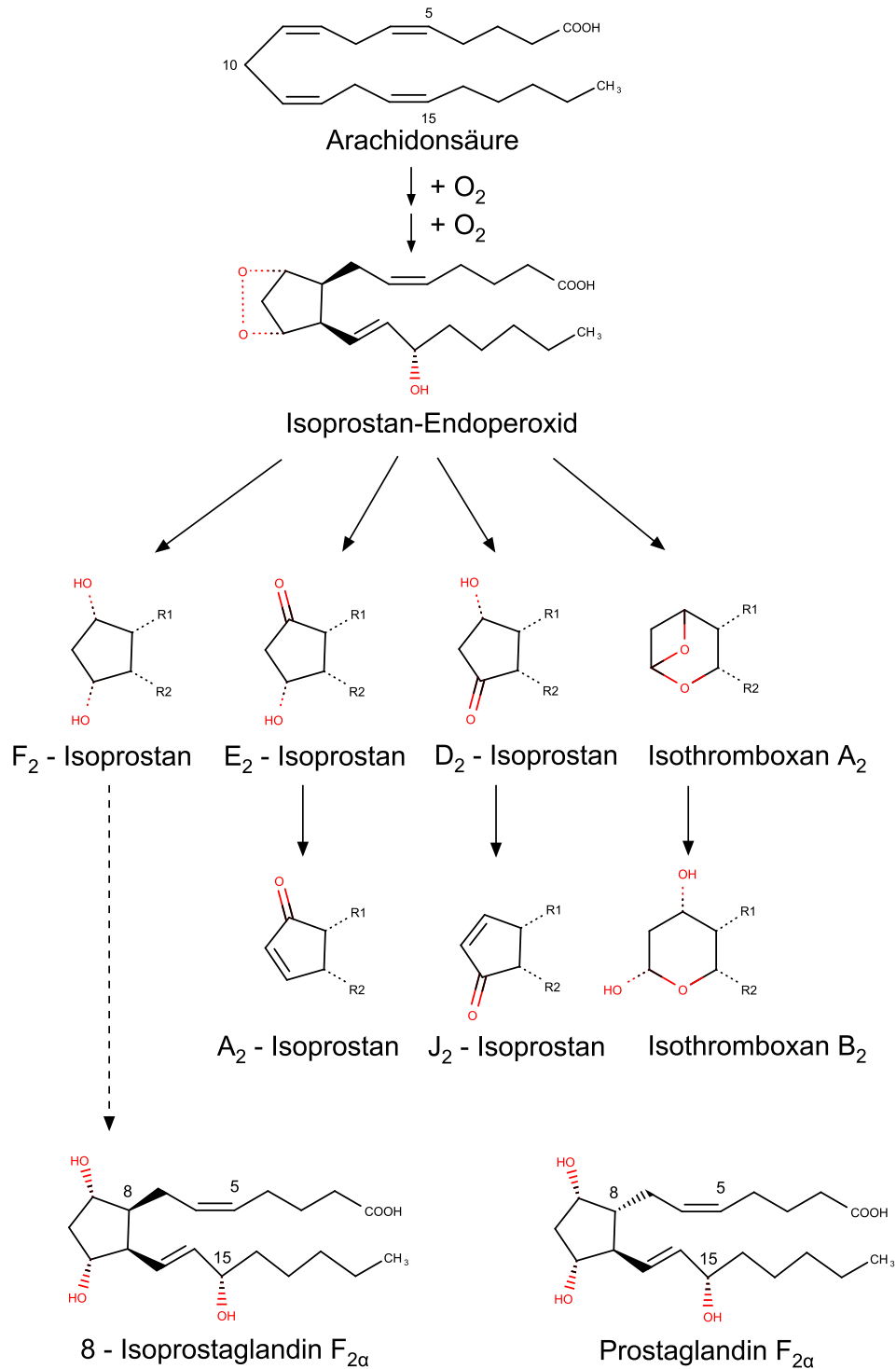


Abb. 2.4.: Darstellung von Struktur, Benennung und Zählweise der Isoprostane am Beispiel von Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ (Abb. in Anlehnung an [48]); der Unterschied zwischen Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ und Prostaglandin $F_{2\alpha}$ liegt in einer anderen Ausrichtung an Position 8.

2.5.3. Bildung der Isoprostane

Die Bildung der Isoprostane erfolgt über eine Lipidperoxidation der Arachidonsäure von Zellmembranen. Der erste Schritt dabei wird durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelöst. Bei diesem Mechanismus kommt es zuerst zur Abspaltung eines (labilen) bisallylischen Wasserstoffatoms und durch die Addition eines Sauerstoffmoleküls an eines der drei möglichen Arachidonylradikale zur Bildung eines Peroxylradikals (s. Abb. 2.5). Abhängig vom Ort der Wasserstoffabstraktion und der erfolgten Sauerstoffinsertion können vier unterschiedliche Peroxylradikale gebildet werden. Nach einer Zyklisierung des Radikals und der Addition eines weiteren Sauerstoffmoleküls entsteht eines von vier möglichen instabilen Bicycloendoperoxid-Intermediaten, welches abschließend spontan zu dem jeweiligen Isoprostan-Regiomere reduziert wird. Die Benennung dieser Regiomere erfolgt anhand der Position der Hydroxylgruppe in der Seitenkette. [26, 29, 47, 58, 59]

Der Vorschlag eines alternativen Bildungswegs [60] wurde in der verfügbaren Literatur kritisch diskutiert [40, 59, 61, 62] und hat sich bisher nicht etabliert.

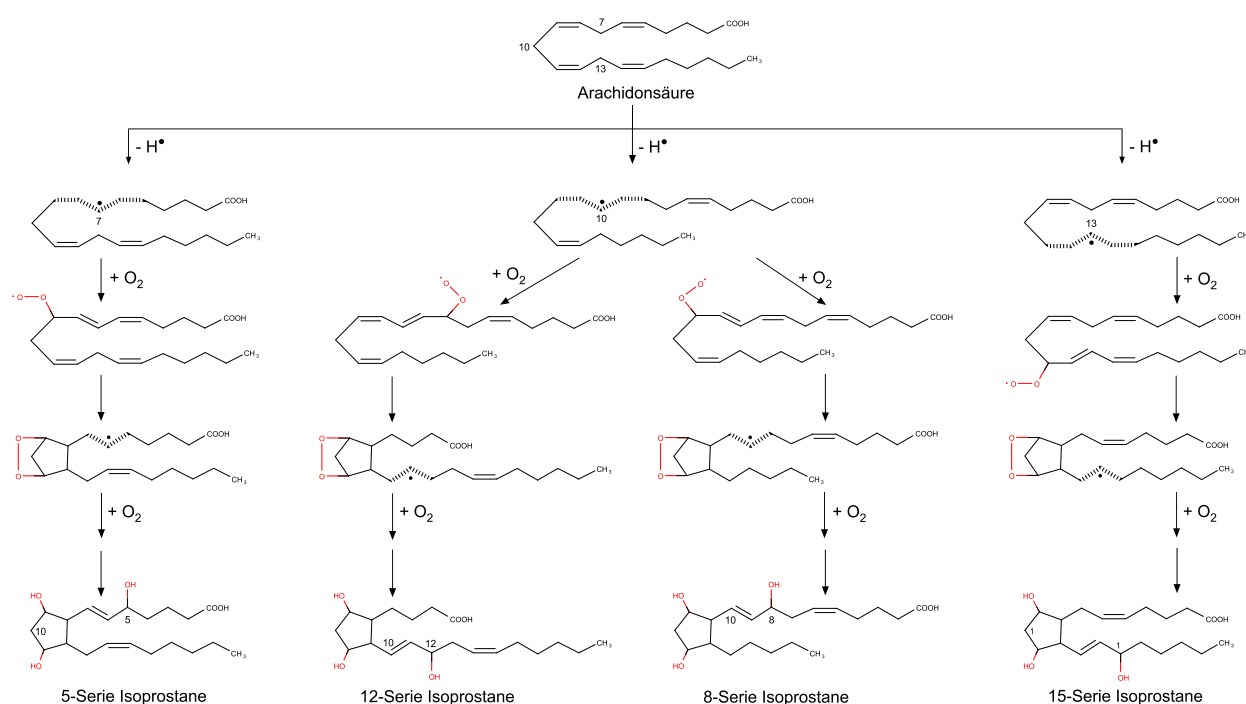


Abb. 2.5.: Darstellung des Mechanismus der Isoprostan-Bildung (Abb. in Anlehnung an [48]); ausgehend von Arachidonsäure wird nach Wasserstoffabstraktion und Sauerstoffinsertion eines von vier möglichen Peroxylradikalen gebildet. Durch Zyklisierung und Addition eines weiteren Sauerstoffmoleküls erfolgt die Bildung einer von vier möglichen Isoprostan-Subspezies, den sogenannten Regimere, welche jeweils theoretisch 32 Stereoisomere beinhalten.

Die Reduktion der Isoprostan-Endoperoxide, also der letzte Schritt der Isoprostan-Bildung, ist nicht vollständig effizient. Durch Umlagerungen *in vivo* kann es hierbei zur Bildung von Isoprostanen mit anderen Ringstrukturen (s. Abb. 2.4 auf der vorherigen Seite) kommen [50, 54, 63, 64], welche aber aufgrund der geringeren Stabilität als Marker einer Lipidperoxidation nicht geeignet sind [50].

Obwohl in dem beschriebenen Bildungsmechanismus die erste Abspaltung an jedem der bisallylischen Wasserstoffatome der Arachidonsäure mit gleicher Wahrscheinlichkeit erfolgen kann, werden die unterschiedlichen Isoprostan-Regiomere nicht zu gleichen Mengen gebildet [41, 48, 58, 65]. Wird

Arachidonsäure *in vitro* oder *in vivo* oxidiert, werden die Regiomere der 5- und 15-Serie in signifikant höheren Mengen im Vergleich zu Isomeren der 8- oder 12-Serie erzeugt [51]. Durch die im Vergleich zu den anderen Regiomerstärkere bzw. bevorzugte Bildung konzentrierte sich die Analytik auf die Verbindungen der 5- und 15-Serie [52]. Nach Yin et al. [41] können Intermediate der 8- oder 12-Serie in einer Nebenreaktion weiteroxidieren, dieses ist im Bildungsweg der 5- und 15-Serie hingegen nicht möglich und diese Regiomere akkumulieren daher im Gewebe und in Körperflüssigkeiten [48, 52, 59]. Eine weitere und einfache Erklärung zur Dominanz der 5- und 15-Regiomere bieten Morrow und Roberts [54] an: Unter der Annahme, dass die Wahrscheinlichkeit der Arachidonylradikalbildung gleich groß ist, handelt es sich bei der 12- und 8-Serie um Regiomere, welche - im Gegensatz zu den anderen Regiomerstärker - aus demselben Arachidonylradikal-Vorläufermolekül entstehen (s. Abb. 2.5 auf der vorherigen Seite). Daraus ergibt sich statistisch eine höhere Bildungswahrscheinlichkeit der 5- und 15-Serie. [54]

Laut der verfügbaren Literatur besteht jeder der vier Regiomer-Subtypen aus 16 Stereoisomeren (acht racemischen Diastereomerenpaaren), insgesamt können bei der Peroxidation der Arachidonsäure dadurch 64 Isomere gebildet werden [48, 66]. Allerdings enthalten die Moleküle der Isoprostane jeweils fünf Stereozentren und damit sind theoretisch $2^5 = 32$ Stereoisomere pro Regiomer und somit 128 Isoprostan-Isomere insgesamt denkbar. Lediglich Yin et al. [67] berichten von 128 theoretisch möglichen Isomeren, die übrige verfügbare Literatur beschreibt 64 potentielle Isomere. Die Unterschiede zwischen den Literaturangaben und der Theorie liegt im Bildungsweg begründet: Da beide Hydroxylgruppen des Prostanrings aufgrund der Endozyklisierung zueinander in *cis*-Stellung vorliegen müssen (s. Abb. 2.5 auf der vorherigen Seite) „blockiert“ dieser Bildungsmechanismus eines der Stereozentren. Effektiv sind bei der Isoprostanbildung nur vier Stereozentren wirksam, daher können lediglich 16 Stereoisomere pro Regiomer *über den beschriebenen Mechanismus* gebildet werden. [42, 67–69]

Isoprostane mit zueinander trans-ständigen Hydroxylgruppen am Prostanring wie beispielsweise IPG $F_{2\beta}$ (s. Tab. 4.8 auf Seite 32) werden über einen anderen Bildungsweg erzeugt und wurden in Realproben bisher nicht beobachtet [70]. Gemäß einem privaten Schriftverkehr mit Prof. Dr. Huiyong Yin werden diese β -Isomere nicht direkt über eine Endozyklisierung erzeugt, sondern durch Reduktasen aus D_2 - oder E_2 -Prostaglandinen bzw. Isoprostanen gebildet, ein Mechanismus, durch den die Hydroxylgruppen des Prostanrings auch entgegengesetzt ausgerichtet vorliegen können. Dieses entspricht den Angaben von Morrow und Roberts [71], wonach stereospezifische Enzyme aus D-Prostanringen trans-ständige F-Prostanringe bilden können.

2.5.4. Unterschiede zwischen Prostaglandinen und Isoprostanen

Vor 1990 galten für Prostanoiden zwei wesentliche Dogmen: die Bildung erfolgt ausschließlich durch das Enzym Cyclooxygenase [3, 72] und Prostanoiden kommen nicht mit Phospholipiden verestert vor [22]. Der neu beschriebene nicht-enzymatische, radikalische Bildungsmechanismus und die *in situ*-Bildung der Isoprostane in veresterter Form mit erst anschließender Freisetzung in den Blutkreislauf [24, 73] negierte diese beiden Grundsätze.

- a) Prostaglandine werden enzymatisch gebildet und sind enantiomerenrein, Isoprostane werden radikalisch erzeugt und liegen racemisch vor

Als grundsätzlicher Unterschied zwischen Prostaglandinen und Isoprostanen galt lange Zeit die Art der Bildung: enantiomerenreine enzymatische Bildung der Prostaglandine, hingegen racemisch-radikalisches Vorkommen der Isoprostane. Dieser Grundsatz von Bildung und Stereoselektivität wird in der verfügbaren Literatur jedoch kontrovers diskutiert.

Nach Jahn et al. [74] ist die enzymatische Bildung der Prostaglandine ein Vorgang von hoher Stereoselektivität, der radikalische Prozess der Isoprostane hingegen ohne sterische Präferenz. Gemäß Yin et al. [46, 61] können Prostaglandine sowohl enzymatisch als auch Enzym-unabhängig aus Endoperoxiden mit trans-Seitenketten analog zum Isoprostanweg gebildet werden. Im letzteren Fall

liegen sie - wie Isoprostane - als racemische Mischung vor, die enzymatische Bildung hingegen ist enantiomerenrein. [46, 48, 61]

Zusätzlich gibt es diverse Überschneidungen zwischen den postulierten Entstehungswegen. Beispielsweise wird berichtet, dass Prostaglandin $F_{2\alpha}$ hauptsächlich über den Isoprostanweg statt enzymatisch gebildet wird [46, 73]. Andersherum gibt es Hinweise auf eine enzymatische Bildung von Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ *in vitro* [27, 75] und *in vivo* [76]. Nach derzeitigem Wissensstand ist der Beitrag des enzymatisch produzierten IPG $F_{2\alpha}$ zur *in vivo* erzeugten Gesamtmenge vernachlässigbar gering und damit kein Hindernis der Verwendbarkeit von IPG $F_{2\alpha}$ als Marker des oxidativen Stresses [3, 77–79].

- b) Prostaglandine werden ausschließlich aus freier Arachidonsäure gebildet, Isoprostane aus veresterter Arachidonsäure erzeugt und erst danach freigesetzt

Prostaglandine werden ausschließlich aus freier Arachidonsäure gebildet [48, 59], Isoprostane hingegen entstehen *in situ* aus mit Phospholipiden veresterter Arachidonsäure und werden danach durch Esterasen freigesetzt [43, 80]. Der für die *in vivo* Freisetzung der Isoprostane aus den Membranphospholipiden verantwortliche Mechanismus ist größtenteils unbekannt, es werden Phospholipasen [29, 43, 81, 82] und insbesondere das Enzym Phospholipase A_2 in diesem Zusammenhang diskutiert [25, 50, 83–85].

- c) eine unterschiedliche Ausrichtung der Kohlenstoffketten: Prostaglandine *ausschließlich* trans, Isoprostane *vorwiegend* cis

Bezogen auf den Prostanring des Moleküls liegen die Seitenketten der Prostaglandine *ausschließlich* in trans-Ausrichtung vor (s. Abb. 2.4 auf Seite 9), bei den Isoprostanen *vorwiegend* in einer cis-Orientierung [3, 47]. Gemäß Rokach et al. [60] sind die Hauptprodukte des Isoprostan-Bildungsweges cis-ständig, und nur ein geringer Teil wird trans-ständig gebildet, diese trans-Isoprostane stellen also Nebenprodukte dar. Laut Davies [44] liegen nur etwa 10 % der Isoprostane mit Seitenketten in trans-Position relativ zum Prostanring vor, weil bei nicht-enzymatischen Reaktionen die energetisch günstigeren Varianten (cis) bevorzugt gebildet werden.

Die Strukturformel des radikalisch gebildeten IPG $F_{2\alpha}$ unterscheidet sich vom enzymatisch gebildeten PG $F_{2\alpha}$ lediglich in der Ausrichtung an Position 8 (s. Abb. 2.4 auf Seite 9). Dennoch können aufgrund der Möglichkeit einer Bildung von trans-konfigurierten Isoprostanen keine absoluten Strukturelemente zur Differenzierung von Prostaglandinen und Isoprostanen festgelegt werden, Unterschiede ergeben sich daher vorrangig durch die Bildungswege.

2.5.5. Eigenschaften und Wirkungen von Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$

Die folgenden Angaben (s. Tab. 2.1) stammen aus der human metabolome database (www.hmdb.ca, Eintrag unter der Kennung HMDB0005083, zuletzt überprüft am 17.10.2019).

Tab. 2.1.: physiko-chemische Eigenschaften von IPG $F_{2\alpha}$

CAS-Nummer	27415-26-5
Summenformel	$C_{20}H_{34}O_5$
durchschnittliche molare Masse	354,481 g/mol
monoisotopische molare Masse	354,240624198 g/mol
pKs (Carbonsäurefunktion)	4,36
logP	2,183
Löslichkeit in Wasser	0,12 g/L

Zum pKs von 4,36 liegen sowohl die ungeladene wie auch die geladene Form des Moleküls zu jeweils 50 % vor, bei einem pH < 2 tritt das Molekül nahezu ausschließlich in ungeladener Form auf.

In vielen Organen wie beispielsweise Niere oder Lunge wirkt IPG F_{2α} vorwiegend als potenter Vasokonstriktor, die biologische Aktivität anderer Isoprostane wurde nur wenig untersucht [52]. Da IPG F_{2α} aus Bestandteilen der Zellmembran gebildet und anschließend durch entsprechende Enzyme lokal freigesetzt wird, sind die vasokonstriktorisches Effekte ebenfalls lokalisiert [4]. Aufgrund des Verdünnungseffektes im Kreislauf ergibt sich keine systemische Wirkung [4]. In der Lunge zeigt sich zusätzlich ein bronchokonstriktorisches Effekt [86–88]. Diese Vorgänge können für Taucher unter hyperbar-hyperoxischen Bedingungen von besonderer Bedeutung sein.

Ein eindeutiger Beweis für die Existenz eines eigenen Isoprostan-Rezeptors wurde bisher nicht erbracht, die Hypothese jedoch auch nicht schlüssig widerlegt. Über welche Art von Rezeptoren die Isoprostan-Wirkungen vermittelt werden ist nicht geklärt und wird kontrovers diskutiert [4, 54, 89]. Möglicherweise wird die Wirkung über Veränderungen der Membranfluidität und -integrität ausgeübt [43]. Eine Veränderung der Membranfluidität kann zur Inaktivierung von membranständigen Rezeptoren oder Enzymen führen und dadurch die normale Zellfunktion beeinflussen [25]. In diesem Fall könnte ein Herauslösen der Isoprostane aus den Membranen durch Phospholipasen als ein Reparaturmechanismus zur Wiederherstellung der Zellmembranintegrität angesehen werden [84].

Isoprostane sind in allen Geweben und Körperflüssigkeiten nachweisbar und deuten damit auf einen physiologischen oxidativen Stresslevel hin [50, 54], welcher nicht durch die antioxidative Abwehr unterdrückt wird [81, 90]. Eine verstärkte Zufuhr exogener Antioxidantien (z. B. Vitamine) scheint nur bereits erhöhte Level von oxidativem Stress zu reduzieren, nicht aber ein bestehendes Normalniveau dadurch weiter zu verringern [91]. Der Gehalt von Isoprostaglandin F_{2α} liegt um etwa eine Zehnerpotenz höher als bei enzymatisch produziertem Prostaglandin F_{2α} [28]. Dieses wird in der verfügbaren Literatur dahingehend gedeutet, dass es sich bei der Bildung von Isoprostanen um einen Hauptweg zum Abbau von Arachidonsäure handeln könnte [3, 22, 59, 81, 90].

Es wird von einer zunehmenden Isoprostan-Bildung mit steigendem Alter berichtet, dieses kann als Hinweis auf die Hypothese angesehen werden, dass der normale Alterungsprozess mit zunehmenden oxidativen Schäden an wichtigen Biomolekülen zusammenhängt [22, 24, 54].

Bei Isoprostanen ist der Aspekt der Selbst-Fortpflanzung (Radikalkettenreaktion) wesentlich [92]. Diese läuft weiter bis das vorhandene Substrat aufgebraucht ist oder ein Abbruch erfolgt. In dieser Hinsicht unterscheidet sich die Lipidperoxidation im Organismus fundamental von anderen Reaktionen mit freien Radikalen, da es sich hierbei um einen selbsterhaltenden Prozess handelt, der zu beträchtlichen Gewebeschäden führen kann [93].

Ob Isoprostane lediglich Marker für einen oxidativen Schaden oder auch selbst an pathologischen Vorgängen beteiligt sind, ist bisher nicht geklärt [94].

2.5.6. Isoprostane in biologischen Matrices

Die Messung von Isoprostanen aus Urin ist nicht-invasiv und wird daher zur Bestimmung des oxidativen Stresses *in vivo* bevorzugt. Ein signifikanter Anteil der Isoprostane (ca. 40 %) liegt im Urin glucuronidiert vor [54, 95, 96] (siehe unter 2.5.7 auf der nächsten Seite). Dennoch werden Isoprostane in dieser Matrix üblicherweise in der freien Form analysiert [96]. Bei der Analytik muss die Ausscheidung über den Creatiningehalt normalisiert werden [97], um unterschiedliche Konzentrationen verschiedener Urine auszugleichen. Zu Referenzbereichen von IPG F_{2α} in der Matrix Urin gibt es in der verfügbaren Literatur unterschiedliche Angaben (s. Tab. 2.2 auf der nächsten Seite).

Tab. 2.2.: Literaturangaben zu Referenzbereichen von IPG F_{2α} in Urin

Referenzbereich	Einheit	Jahr	Literaturquelle
500 - 3000	pg/mg Creatinin	1991	[71]
1,6 ± 0,6	ng/mg Creatinin	1996	[66]
1144 ± 16	pg/mg Creatinin	1999	[98]
426 ± 56	pg/mg Creatinin	2000	[99]
216 ± 101	pg/mg Creatinin	2003	[70]
250 ± 150	pg/mg Creatinin	2003	[100]
55 - 348	pg/mg Creatinin	2007	[101]
57 - 390	pg/mg Creatinin	2007	[102]
294 ± 104	pg/mg Creatinin	2007	[103]
1,62 ± 1,51	ng/mg Creatinin	2012	[104]
106 ± 6	pg/mL	2015	[105]
500 ± 700	pg/mg Creatinin	2017	[106]

Die Unterschiede der angegebenen Bereiche resultieren möglicherweise aus unterschiedlichen Mess-techniken. Beispielsweise liegen nach Sircar und Subbaiah [107] die Messwerte von GC-MS-Verfahren um den Faktor 4-5 höher als bei LC-MS/MS-Messungen (s. hierzu mehr unter 2.6.3 auf Seite 19). Auch ist teilweise nicht eindeutig, ob es sich bei den Angaben um die Summe mehrerer Isomere oder um einen einzelnen Analyten handelt. Zusätzlich wurden oft verschiedene Probandenkollektive betrachtet. Einige Autoren untersuchten nur Frauen oder Kinder, andere Studien hingegen Probanden mit einer speziellen Ernährung oder Erkrankung.

Im Gegensatz zu anderen Matrices ist bei Urin die Stabilität von IPG F_{2α} kein analytisches Problem. Es kommt nicht zu einer Artefaktbildung durch Autoxidation, da in Urin üblicherweise sehr wenig Lipide bzw. Arachidonsäure vorhanden sind [3, 4]. Laut Literatur erfolgte nach einer Lagerung von zehn Tagen bei Raumtemperatur keine artifizielle Bildung von Isoprostanen *ex vivo* [108], ebenso stiegen die Werte bei einer Inkubation mit 37 °C über eine Woche hinweg nicht an [81]. Messungen von IPG F_{2α} in Morgen- oder Spontanurin repräsentieren adäquat die tägliche Isoprostan-Ekretion bei Menschen. Auf eine aufwändige 24-Stunden Urinsammlung kann daher verzichtet werden [78, 109]. Es gibt keine signifikante Tagesvariabilität der Isoprostan-Konzentration im Urin bei gesunden Probanden, die Tag-zu-Tag Variabilität wird als gering beschrieben [20]. Die Analyse von IPG F_{2α} aus Spontanurin gilt als zuverlässiger Index des systemischen oxidativen Stresses *in vivo* [110]. Isoprostane werden mit einer Halbwertszeit von 16 Minuten aus dem Blutkreislauf eliminiert, eine diagnostische Aussage einer Blutprobe ist damit nur über einen kurzen Zeitraum möglich [3, 111]. Bei Blutproben kann es während der Probenbearbeitung oder Lagerung zu einer nachträglichen Bildung von Isoprostanen kommen [29]. Serum ist als Matrix zur Bestimmung von IPG F_{2α} ungeeignet, da der Koagulationsprozess zu einer *ex vivo* Bildung des Zielanalyten führt [106]. In Plasma wird von starken inter-individuellen Schwankungen des Basallevels von IPG F_{2α} berichtet, dabei gibt es keinen circadianen Rhythmus der Isoprostan-Sekretion [23, 112].

2.5.7. Metabolismus von Isoprostaglandin F_{2α}

Der Metabolismus von Isoprostanen allgemein ist weitgehend unbekannt, Untersuchungen wurden vorwiegend an dem Isomer IPG F_{2α} durchgeführt [20, 54]. Nach der Freisetzung der Isoprostane durch Phospholipasen in die Zirkulation [43] erfolgt der Transport im Kreislauf über Lipoproteine, vorwiegend high density lipoprotein (HDL) [113]. Ein Teil der Isoprostane wird per β-Oxidation metabolisiert, diese Metabolite und die übrigen freien Isoprostane werden effizient renal ausgeschieden [23].

Als Hauptmetabolit wurde in menschlichem Urin 2,3-dinor-5,6-dihydro-IPG $F_{2\alpha}$ (s. Abb. 2.6) identifiziert [54, 95, 114, 115]. Dieser Metabolit soll zu ca. 29 % bezogen auf die Ausgangssubstanz gebildet werden [54], er entsteht im Organismus durch eine β -Oxidation und anschließende Reduktion der Δ -5-Doppelbindung (s. Abb. 2.6) [95, 116]. Hierbei handelt es sich um einen ungewöhnlichen Hauptmetaboliten, da die Hydrierung einer Doppelbindung im Metabolismus selten vorkommt und keine typische Phase-I-Reaktion ist. Bei der Metabolisierung der eng verwandten Prostaglandine werden Doppelbindungen üblicherweise nicht reduziert [54], die Metabolite von PG $F_{2\alpha}$ bestehen hauptsächlich aus Tetranor-Produkten [44, 117].

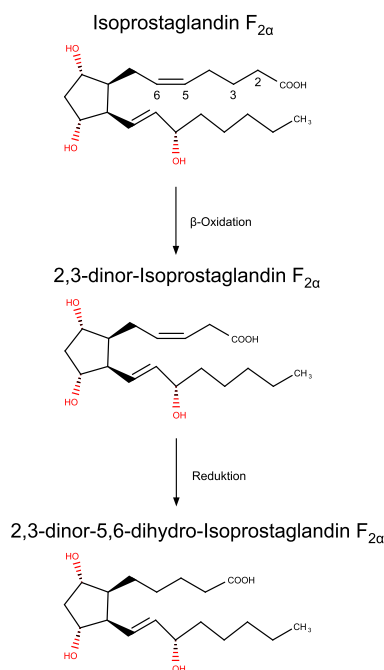


Abb. 2.6.: Darstellung der Bildung des humanen Hauptmetaboliten von Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ (Abb. in Anlehnung an [85]); aus IPG $F_{2\alpha}$ wird durch β -Oxidation und anschließender Reduktion der Metabolit 2,3-dinor-5,6-dihydro-IPG $F_{2\alpha}$ gebildet.

Als Phase-II-Metabolite liegen etwa 40 % der Isoprostane in Urin als Glucuronide vor [54, 95, 96], Chiabrando et al. [116] berichten auch von Taurinkonjugaten. Die Struktur des IPG $F_{2\alpha}$ -Glucuronid-Konjugats ist bisher nicht aufgeklärt [118], ein Vorschlag dafür wurde von Milne et al. [119] beschrieben (s. Abb. 2.7 auf der nächsten Seite). Nicht nur die Identität, auch die Zahl der möglichen IPG $F_{2\alpha}$ -Glucuronide ist unbekannt. Theoretisch könnten aufgrund der drei Hydroxyl- und einer Carboxylgruppe insgesamt bis zu vier unterschiedliche O-Glucuronide gebildet werden [120]. Untersuchungen über oder Berichte von mehrfachen Glucuronidierungen konnten in der verfügbaren Literatur nicht gefunden werden, ebenso sind keine Angaben über die Mengen der gebildeten Taurinkonjugate verfügbar.

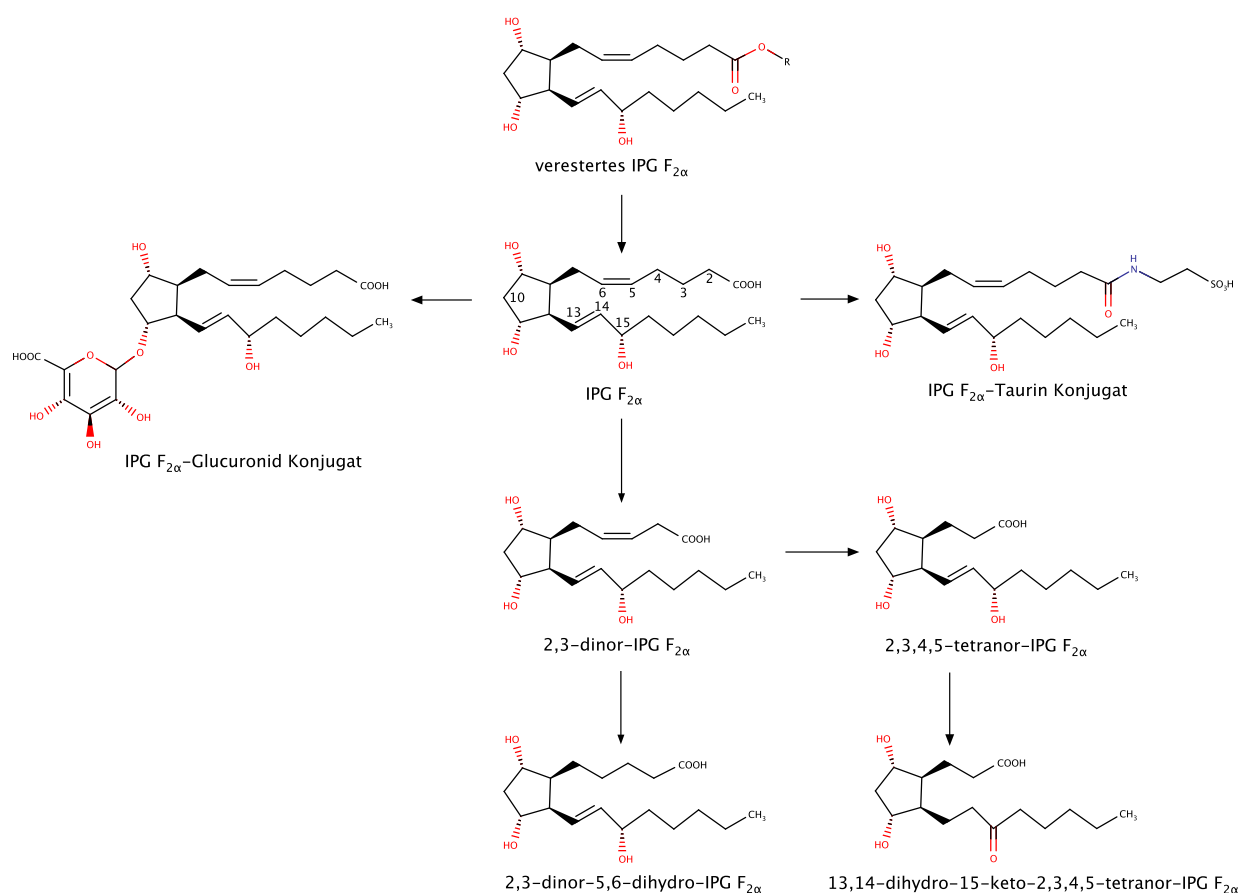


Abb. 2.7.: Darstellung des Metabolismus von Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ (Abbildung in Anlehnung an [119]); aus der Veresterung freigesetztes IPG $F_{2\alpha}$ kann im Organismus über Phase I-Reaktionen umgewandelt oder in Phase II-Reaktionen mit Substraten wie Glucuronsäure oder Taurin gekoppelt werden. Dabei können die verschiedenen in der Abbildung dargestellten Metabolite gebildet werden.

Das Ausmaß der Glucuronidierung von Isoprostanen wird kontrovers diskutiert. Üblicherweise wird eine Glucuronidierungsrate von 30-40 % angegeben [54, 95, 96, 121–123]. In der Literatur finden sich auch davon abweichende Werte, beispielsweise 28-80 % nach Langhorst et al. [124] oder 36-100 % nach Medina et al. [38]. Wegen dieser differierenden Angaben ist von inter-individuellen Unterschieden in der Glucuronidierungsleistung auszugehen.

Aufgrund der verfügbaren Literatur ist unklar, ob Urinmetabolite sensitivere Biomarker des oxidativen Stresses sind als IPG $F_{2\alpha}$ [125]. Metabolite können nicht *ex vivo* durch Autoxidation gebildet werden und somit keine Artefakte sein. Allerdings kann der Hauptmetabolit von IPG $F_{2\alpha}$ in Urin 2,3-dinor-5,6-dihydro-IPG $F_{2\alpha}$ auch durch eine direkte Oxidation von gamma-Linolensäure gebildet werden, dieses schränkt die analytische Aussagekraft ein [58]. Auch gibt es in der verwendeten Literatur keinerlei Angaben über mögliche Glucuronidierungen oder andere Phase II-Reaktionen von beispielsweise dem humanen Urin-Hauptmetaboliten 2,3-dinor-5,6-dihydro-IPG $F_{2\alpha}$.

Im überwiegenden Teil der Literatur wurde der unmetabolisierte Anteil von Isoprostanen aus Urin gemessen [118]. In der vorliegenden Arbeit wurde auf eine Hydrolyse der Glucuronide verzichtet und der freie Anteil der Isoprostane gemessen. Es wurde ein Vergleich von Messwerten desselben Individuums zu unterschiedlichen Zeitpunkten (vor und nach Tauchgängen) angestrebt, dabei wurde von einer konstanten intra-individuellen Glucuronidierungsleistung ausgegangen.

2.6. Analytik von Isoprostanen

Isoprostane zeigen als Marker für oxidativen Stress verschiedene Vorteile (Aufzählung in Anlehnung an Yin und Porter [40] bzw. Roberts und Morrow [50]):

1. chemisch stabile Komponenten
2. spezifische Produkte einer Lipidperoxidation
3. in allen normalen Geweben und biologischen Flüssigkeiten in detektierbaren Mengen vorhanden, damit Definition von Referenzwerten möglich
4. Werte steigen bei oxidativem Stress in Tiermodellen deutlich an
5. werden durch den Fettgehalt und Zusammensetzung der Nahrung nicht beeinflusst [23, 28, 50, 126–128]

Der Biomarker IPG $F_{2\alpha}$ ist in messbarer Menge in allen Körperflüssigkeiten zu finden und spiegelt im Urin die systemische und nicht eine renale Bildung des Zielanalyten wieder [78, 129]. Isoprostane sind in Lebensmitteln nachweisbar, werden jedoch nicht in ausreichender Menge durch den Gastrointestinaltrakt aufgenommen um die Plasma- oder Urinkonzentration beeinflussen zu können [11, 85, 127, 130]. Vorstufen der Isoprostane sind im Körper auch bei stark erhöhtem oxidativem Stress nicht detektierbar und daher als Biomarker nicht verwendbar [50].

Die Hauptprobleme der Isoprostan-Analytik liegen in der Vielzahl strukturell eng verwandter Substanzen mit sehr ähnlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften und den sehr niedrigen Konzentrationen in Blut und Urin. Daher sind selektive und hochsensitive Methoden zur Messung nötig, oft in Kombination mit langen und komplexen Extraktionen und Aufarbeitungen. [117, 131, 132]

Zur Bestimmung von Markersubstanzen in einem biologischen System sind zwei Schlüsselvoraussetzungen wesentlich [17]:

a) Verhinderung der Bildung von Artefakten

Da meist nur sehr kleine Mengen eines Biomarkers im Vergleich zur Menge des unmodifizierten Precursor-Biomoleküls vorliegen, kann selbst eine nur geringe Artefaktbildungsrate während der Probenlagerung, Bearbeitung und Analyse den Basallevel des Biomarkers erreichen oder sogar weit übersteigen. So kommen Isoprostane im Plasma in einem Bereich von pmol/L, die entsprechende Vorläuferverbindung Arachidonsäure hingegen in Konzentrationen von $\mu\text{mol/L}$ bis mmol/L und damit um einen Faktor bis über 1.000.000 konzentrierter vor. [17]

b) Selektivität und Sensitivität der Messmethode

Aufgrund der geringen Konzentration des Zielanalyten ist eine Messmethode mit entsprechender Leistungsfähigkeit nötig, um den Basallevel eines Biomarkers und auch geringe Veränderungen daran sicher und genau messen und quantifizieren zu können [17].

Eine direkte Messung freier Radikale ist aufgrund der Reaktivität und der daraus folgenden Kurzlebigkeit nicht möglich, daher konzentrieren sich die Untersuchungen auf die Messung von End- oder Nebenprodukten der entsprechenden Reaktionen [28]. Eine Ausnahme stellt die Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping Spectroscopy dar. Diese Technik ist geeignet um kurzlebige Spezies wie Superoxid- und Hydroxylradikale zu messen. Sie wird aber aufgrund der Toxizität der verwendeten Spin Traps üblicherweise nicht *in vivo* verwendet [12, 133]. Ferner sind die biologisch relevanten Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies zu niedrig, um über dieses Verfahren quantifiziert werden zu können [134].

2.6.1. Entwicklung und Veränderung der Isoprostan-Analytik

Nach Langhorst et al. [124] sind die meisten publizierten Methoden zur Messung von Isoprostanen arbeitsaufwändig, nicht ausreichend validiert und haben niedrige Wiederfindungsraten.

Die ersten beschriebenen Routinemethoden beinhalten lange und komplexe Aufarbeitungen wie beispielsweise zweifache Festphasenextraktion (SPE) nach einer zweifachen Dünnschichtchromatographie (TLC) und Messung mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie mit negativer chemischer Ionisierung (GC-NCI-MS) nach zweifacher Derivatisierung [135]. In anderen Methoden wurden nach zweifacher SPE die beiden TLC-Schritte durch eine präparative Flüssigchromatographie (LC) zur Fraktionierung ersetzt [98]. Bezogen auf diese frühen und komplexen Aufarbeitungen wurde eine Arbeitszeit von 7,5 Stunden für einen Ansatz zuzüglich der reinen Geräte-Messzeit von etwa 15 Minuten pro Probe beschrieben. Musiek et al. [136] kommen daher zu dem Schluss, dass ein erfahrener Labortechniker nur 15-20 Proben pro Tag mit einer solchen Methode bearbeiten kann.

Die Aufbereitungsverfahren vereinfachten sich parallel zur Weiterentwicklung der Messtechnik. Durch die Einführung der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) konnte beispielsweise auf Derivatisierungen verzichtet werden und lange flüssigchromatographische Messungen ersetzen die vorher verwendeten komplexen Aufarbeitungen durch einfachere Probenextraktionen [99, 137–140]. Eine Reihe von Quellen beschreibt eine Aufreinigung mittels Immunoaffinitätskartuschen (IAC), diese kann klassische Extraktionsverfahren wie Festphasenextraktion oder Dünnschichtchromatographie ersetzen und liefert dabei eine höhere Selektivität [49, 97, 127, 141–143]. Die Nachteile einer Immunoaffinitätsextraktion entsprechen denen von Immunoassays (s. unter 2.6.2 auf der nächsten Seite). Zur Minimierung des Arbeitsaufwands wurden automatisierte Verfahren beschrieben wie beispielsweise online-SPE [101, 124]. Methoden ohne Extraktionsschritte sind in der verfügbaren Literatur kaum zu finden. Lediglich Saenger et al. [102] beschreiben eine Direktinjektion von Matrix und berichten dabei von beobachteten Matrixsuppressionen. Syslova et al. [139] verwenden bei der Analytik von Plasma eine Proteinfällung (PPT), welche als Spezialfall einer Verdünnung einem Dilute & Shoot-Verfahren ähnlich ist.

Durch die Veränderungen der Messtechnik von Gaschromatographie (GC) zu Flüssigchromatographie (LC) und von Massenspektrometrie (MS) zu Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) wurden komplexe und mehrstufige Aufarbeitungen durch einfache Festphasenextraktionen (SPE) [144–146] oder Flüssig-Flüssig-Extraktionen (LLE) ersetzt [70, 147]. Diese Vereinfachung ist eine typische Evolution analytischer Methoden, denn jeder Aufarbeitungsschritt birgt die Gefahr von Verlusten. Es werden Wiederfindungsraten von 20-30 % bei den frühen und aufwändigen Methoden berichtet (2x SPE + 2x TLC + 2x Derivatisierung), ca. 70 % bei zweifacher SPE und ca. 90 % bei Verfahren mit einfacher SPE [145]. Zur Entwicklung und Vereinfachung der Extraktionsmethoden siehe auch Tabelle 2.3 auf Seite 20 und Tabelle 2.4 auf Seite 21.

Zur Bestimmung von Isoprostanen werden derzeit vorwiegend drei unterschiedliche Messtechniken verwendet:

1. Enzym-Immunoassay (EIA)
2. Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS, GC-MS/MS)
3. Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS, LC-MS/MS)

Dazu finden sich in der verfügbaren Literatur unterschiedliche und teilweise kombinierte Aufbereitungsverfahren für komplexe Matrices wie Urin, vorwiegend Festphasenextraktion (SPE), Dünnschichtchromatographie (TLC), Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE), und Extraktionen mittels Immunoaffinitätskartuschen (IAC). Aus der Vielfalt der Kombinationsmöglichkeiten von Extraktionsoptionen und Messtechniken resultiert eine Unübersichtlichkeit und fehlende Standardisierung der Methoden. Ergebnisse unterschiedlicher Labore oder Publikationen sind kaum vergleichbar, zumal oft nicht eindeutig ist, welches Isomer gemessen wurde [118]. Einige Vor- und Nachteile der drei Hauptgruppen von Bestimmungsmethoden werden nachfolgend kurz vorgestellt.

2.6.2. Enzym-Immunoassays (EIA)

Immunoassays zeigen aufgrund von Kreuzreaktivitäten eine schlechte Korrelation und inkonsistente Ergebnisse im Vergleich zu Massenspektrometrie-basierten Messverfahren [97, 100, 111, 148–154]. Vergleiche von drei kommerziellen Immunoassay-Testkits mit Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) ergaben substantiell höhere immunologische Werte für Plasma (bis zu 182x höher) und Urin (bis zu 62x höher). Eine schlechte Korrelation wurde dabei nicht nur zwischen den unterschiedlichen Messtechniken, sondern auch zwischen den einzelnen kommerziellen Testkits festgestellt. [155]

Ein Nachteil der Immunoassays ist die unzureichende Information zu Genauigkeit, Präzision und Selektivität der kommerziell verfügbaren Kits. Bezüglich der Sensitivität scheint es zwischen verschiedenen Herstellern Unterschiede zu geben. [50, 83, 110, 156]

Trotz der genannten Limitierungen sind Immunoassays aufgrund geringer Gerätekosten und der im Vergleich zur Massenspektrometrie einfachen Handhabung wesentlich für die Isoprostanforschung gewesen [157], obwohl die Aufarbeitung fast ebenso umfangreich wie bei gaschromatographischen Methoden sein kann und dadurch kein Zeitgewinn erfolgt [59, 156]. Analytverluste bei der Aufarbeitung von Immunoassays werden oft ignoriert [49], dieses ist in der Massenspektrometrie durch die Verwendung isotopenmarkierter interner Standards zur Korrektur kein Problem. Einige Autoren empfehlen Immunoassays nur als semiquantitatives Verfahren [82] und eine Überprüfung der Ergebnisse mittels chromatographischer Methoden [97]. Andere Autoren raten aufgrund systematischer Probleme der Immunoassays und der Ausscheidung von Isoprostanen in konjugierter und freier Form zu einer Messung mittels Tandem-MS-Verfahren [121].

2.6.3. Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS bzw. GC-MS/MS)

Die ursprüngliche Methodik zur Messung von Isoprostanen beruht auf gaschromatographischen Verfahren. GC-MS war die Schlüsseltechnologie zur Messung von Isoprostanen und die Methodik der Entdeckung, Strukturaufklärung, sowie Beschreibung von Bildung, Metabolismus und Referenzbereichen in biologischen Matrices [117]. Zu Beispielen für gaschromatographische Verfahren siehe Tabelle 2.3 auf der nächsten Seite.

Die Messung mittels GC-MS galt lange Zeit als Referenzverfahren [20, 50], wurde aber mit Veränderung der Analysetechnik zur Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) in Kopplung mit Gaschromatographie (GC) oder Flüssigchromatographie (LC) dadurch verdrängt. Nachteilig und zeitaufwändig ist die aufgrund der unterschiedlichen funktionellen Gruppen der Isoprostane nötige zweistufige Derivatisierung [49], um die Analyte flüchtig und damit einer gaschromatographischen Analytik zugänglich zu machen. Die Messung erfolgt meistens mittels negativer chemischer Ionisation (NCI), einem hochsensitiven aber nicht besonders verbreiteten Messmodus, für dessen Anwendung Spezialisten sowie evtl. ein Geräteumbau oder ein separates Messgerät nötig sind. Messungen mittels Elektronenstoßionisation (EI) sind spezifischer als im NCI-Modus, aber wegen der stärkeren Fragmentierung nicht so sensitiv [73, 158]. Die Gerätekosten sind vergleichsweise hoch und die nötige komplexe Probenvorbereitung ist arbeitsintensiv und zeitaufwändig (s. hierzu Tabelle 2.3 auf der nächsten Seite) [80, 81, 156]. Zusätzlich werden vergleichsweise hohe Probenvolumina zur Analyse mittels GC-MS verwendet [159]. Dieses liegt an den komplexen Aufarbeitungen mit dabei teilweise deutlichen Analytverlusten. Jeder Derivatisierungsschritt kostet Zeit und birgt die Gefahr von Verlusten und Artefaktbildung durch Oxidation, weshalb heute derivatisierungsfreie Methoden vorgezogen werden [40]. GC-NCI-MS gilt oft als sensitivstes Messverfahren [25, 83, 97] mit einer langen Analysenzeit von in der Regel 20-40 Minuten pro Lauf [117]. GC-MS/MS ist hochsensitiv, kann aber die Isoprostan-Regiomere im Gegensatz zu LC-MS/MS-Verfahren nicht differenzieren [158, 160]. Bei der Bestimmung von Isoprostanen ergaben gaschromatographische Verfahren im Vergleich zu LC-MS/MS-Messungen um den Faktor 4-5 höhere Werte [107]. Dieses liegt an einer Überlagerung der Isomere 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$, IPG $F_{2\alpha}$ und 9 β -PG $F_{2\alpha}$, welche summarisch als F_2 -Isoprostane angegeben

werden, weil sie bei den gaschromatographischen Methoden üblicherweise nicht getrennt vorliegen. [49, 98, 107, 111, 137, 148]

Tab. 2.3.: Beispiele für GC-Methoden zur Messung von Isoprostanen aus der Matrix Urin

Jahr	Messverfahren	Aufarbeitung	Quelle
1993	GC-MS	LLE+SPE+LLE+TLC	[55]
1996	GC-MS	SPE+LLE+SPE+3xHPLC	[95]
1997	GC-MS/MS	SPE+TLC+HPLC	[76]
1998	GC-MS/MS	SPE+LLE+TLC	[144]
1998	GC-MS/MS	SPE+HPLC+TLC	[144]
1998	GC-MS	SPE+2xTLC	[108]
1999	GC-MS	2xSPE+HPLC	[98]
1999	GC-MS	2xSPE+TLC	[161]
1999	GC-MS	2xSPE+HPLC	[111]
2000	GC-MS/MS	SPE+TLC	[162]
2000	GC-MS/MS	SPE+HPLC+LLE	[162]
2001	GC-MS	2xSPE	[148]
2002	GC-MS	3xSPE	[163]
2003	GC-MS/MS	IAC	[141]
2004	GC-MS	SPE	[164]
2005	GC-MS	LLE+2xSPE	[165]
2007	GC-MS	2xSPE+TLC	[110]
2008	GC-MS	2xSPE	[166]
2009	GC-MS	2xSPE+TLC	[167]
2013	GC-MS	2xSPE+TLC	[118]

2.6.4. Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS bzw. LC-MS/MS)

Ab etwa Mitte der 1990er Jahre wurde über LC-MS/MS-Verfahren zur Bestimmung von Isoprostanen berichtet [49, 65]. Diese Technik erlaubt eine massenspektrometrische Trennung der vier Isoprostan-Regiomerklassen und erhöht damit die Selektivität [65, 158]. Es ist keine Derivatisierung nötig, die Aufarbeitung wird einfach, schnell und zeigt durch weniger potentiell fehleranfällige Schritte eine hohe Wiederfindung. Zu Beispielen für LC-MS-Verfahren siehe Tabelle 2.4 auf der nächsten Seite.

LC-MS/MS gilt oft als weniger sensitiv im Vergleich zu GC-NCI-MS, was jedoch durch höhere Wiederfindungsraten aufgrund der einfacheren Aufarbeitungen (teil-)kompensiert wird. Neuere Geräte und Methoden zeigen eine verbesserte Sensitivität und können als gleichwertig zur GC-NCI-MS angesehen werden [160]. Bezogen auf das Signal-Rauschverhältnis (S/N) werden LC-MS/MS-Methoden mittlerweile im Vergleich zu gaschromatographischen Verfahren als leistungsfähiger beschrieben [168]. Durch die einfachen Aufarbeitungen entstehen nur geringe Materialkosten, die Anschaffungsinvestitionen der Geräte sind aber vergleichsweise hoch und die Handhabung ist komplex. Auch hier sind Experten für die Bedienung nötig. Dafür werden mit minimaler Probenvorbereitung sensitive und selektive Messungen möglich. [70, 99, 100]

Tab. 2.4.: Beispiele für LC-Methoden zur Messung von Isoprostanen aus der Matrix Urin

Jahr	Messverfahren	Bestimmungsgrenze	Injektionsintervall	Aufarbeitung	Quelle
1999	LC-MS/MS	k. A.	ca. 22 min	SPE	[169]
2000	LC-MS	100 pg/mL	ca. 40 min	LLE+SPE	[99]
2003	LC-MS/MS	k. A.	ca. 30 min	LLE	[70]
2003	LC-MS/MS	k. A.	10 min	SPE	[100]
2006	LC-MS/MS	200 pg/mL	30 min	SPE	[170]
2007	LC-MS/MS	25 pg/mL	13 min	PPT+online-SPE	[101]
2007	LC-MS/MS	140 pg/mL	10 min	Direktinjektion	[102]
2007	LC-MS	30 pg/mL	45 min	IAC	[107]
2007	LC-MS/MS	30 pg/mL	20 min	SPE	[103]
2007	LC-MS/MS	k. A.	28 min	2xSPE	[171]
2008	LC-MS/MS	k. A.	18 min	IAC	[172]
2009	LC-MS/MS	21 pg/mL	22 min	SPE	[138]
2009	LC-MS/MS	21 pg/mL	70 min	SPE	[139]
2010	LC-MS/MS	320 pg/mL	40 min	SPE	[173]
2010	LC-MS/MS	178 pg/mL	ca. 9 min	SPE	[151]
2010	LC-MS/MS	348 pg/mL	16 min	online-SPE	[124]
2012	LC-MS/MS	170 pg/mL	15 min	SPE	[174]
2012	LC-MS/MS	60 pg/mL	14 min	LLE	[147]
2013	LC-MS/MS	50 pg/mL	20 min	SPE	[175]

Einige Angaben in der Tabelle wurden zwecks Vereinheitlichung umgerechnet.

2.7. Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS)

Das Interesse an DMS-MS-Kopplungstechniken ist in den letzten Jahren stetig gewachsen, speziell zur Steigerung der Selektivität für die Trennung von Isomeren oder isobaren Substanzen, der Reduktion von hohem Untergrund und Trennung von Zielanalyten und endogenen Matrixinterferenzen [176–178].

Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS) ist ein Verfahren zur Trennung von Ionen anhand der Differenz der Ionenmobilitäten in starken bzw. schwachen elektrischen Feldern in Gasen bei oder nahe Atmosphärendruck. Die Trennung der Ionen erfolgt unter dem periodischen Effekt eines mit asymmetrischer Wellenform zwischen zwei Elektrodenplatten angelegten elektrischen Feldes. [179]

Die grundlegenden Konzepte der DMS gehen auf den Anfang der 1980er Jahre zurück, als russische Wissenschaftler tragbare Sensoren zum Aufspüren von Landminen des Afghanistan-Krieges entwickelten. Anfang der 1990er Jahre arbeiteten zwei unterschiedliche Forschungsgruppen an der Weiterentwicklung dieser Technologie. Eine Kooperation mit der Firma Thermo führte zu einer zylindrischen Elektrodengeometrie. Sie wurde ab 2005 als High Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry (FAIMS) auf den Markt gebracht. Eine andere Gruppe arbeitete an einem planaren Design der Elektroden. Diese Anordnung bekam später den Namen Differential Mobility Spectrometry (DMS). Ab 2007 begann diese Gruppe eine Kollaboration mit der Firma Sciex, welche ab 2010 zur Einführung eines kommerziellen DMS-Systems unter dem Markennamen SelexION führte (s. Abb. 2.8 auf der nächsten Seite). [179, 180]

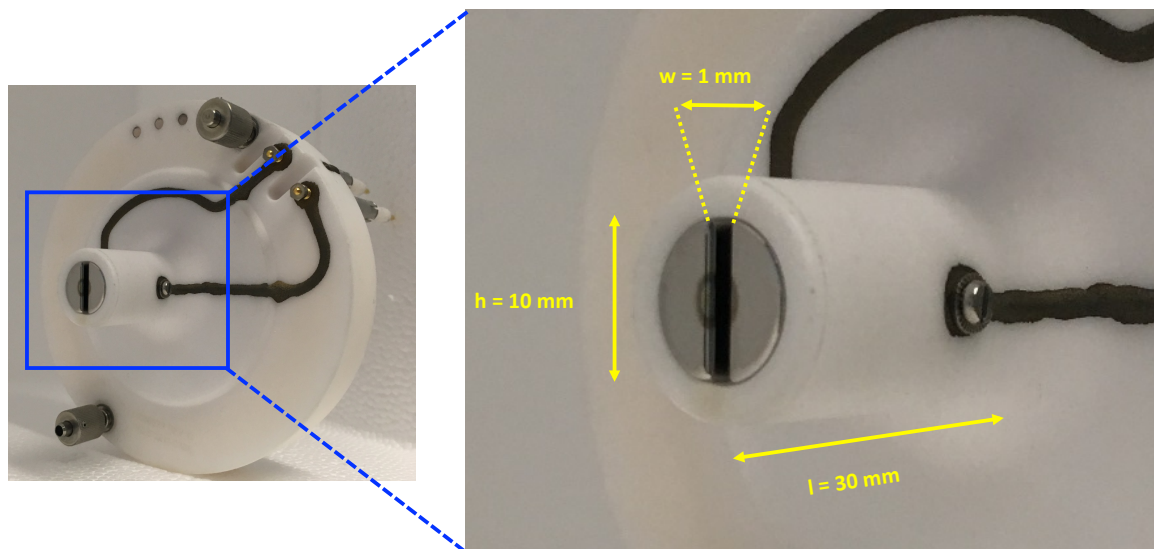


Abb. 2.8.: Aufbau der differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Zelle des SelexION-Moduls, links die Halterung mit der DMS-Zelle, rechts eine Ausschnittvergrößerung der Elektroden. Die Maße der Elektrodenplatten sind mit h = Höhe, w = Breite und l = Länge angegeben.

DMS-Trennungen werden zwischen zwei planaren und parallel angeordneten Elektroden durchgeführt. Ionen driften aufgrund des Gasflusses axial zwischen den Elektrodenplatten, typischerweise bei Atmosphärendruck. Unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes senkrecht zur Flugrichtung wird eine radiale Bewegung erzeugt, welche die Ionenbahnen verändert.

In einem schwachen elektrischen Feld ist der Mobilitätskoeffizient über einen breiten Bereich von Feldstärken konstant. Bei dieser Niedrigfeldmobilität ist die Geschwindigkeit der individuellen Ionenspezies proportional zum Mobilitätskoeffizienten. Somit werden Ionen bei einem gegebenen elektrischen Feld durch die Drift-Zeit charakterisiert, welche mit dem Kollisionsquerschnitt (collision cross section) bzw. der Größe der Ionen korreliert werden kann. Überschreitet die Feldstärke ein gewisses Maß, dann verändern sich die Charakteristika der Ionen, die Mobilität wird feldabhängig und variiert bezogen auf die individuellen Eigenschaften der Ionen und ihrem Verhalten gegenüber dem elektrischen Hochfeld.

Ionen mit derselben Niedrigfeldmobilität können substanziell andere Hochfeldmobilitäten zeigen, dieser Unterschied formt die Basis der DMS. In einer DMS-Zelle werden Ionen alternierend hohen und niedrigen elektrischen Feldern ausgesetzt (s. Abb. 2.9 auf der nächsten Seite). Hohe Feldstärken werden kurzzeitig angelegt. Dabei werden die Ionen in Richtung einer der Elektroden gezwungen. Danach folgt eine längere Niedrigfeldphase mit entgegengesetzter Polarität, welche die Flugbahn der Ionen umkehrt. Da die Hoch- und Niedrigfeld-Phasen nicht gleich lang sind, wurde die Bezeichnung asymmetrische Wellenform (asymmetric waveform) zur Beschreibung verwendet. [179, 181]

Das Produkt aus Feldstärke und Zeit ist dabei in den unterschiedlichen Phasen gleich. Es wirkt also in der Hochfeldphase summarisch die gleiche Kraft auf ein Ion wie in der Niedrigfeldphase, also entweder stärker und kürzer (Hochfeldphase) oder länger und schwächer (Niedrigfeldphase) (s. Abb. 2.9 auf der nächsten Seite).

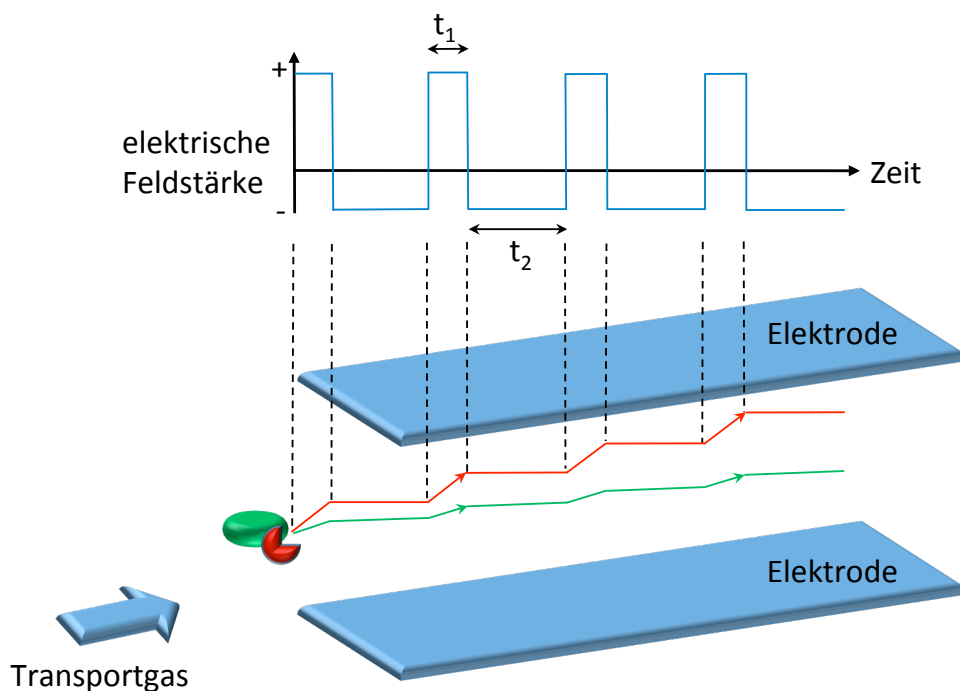


Abb. 2.9.: Darstellung der DMS-Phasen im SelexION-Modul (Abb. in Anlehnung an [182]). In einer kurzen Hochfeldphase (t_1) wirkt summarisch die gleiche Kraft auf die Ionen wie in einer längeren Niedrigfeldphase (t_2), aufgrund der anderen Polarität allerdings in entgegengesetzter Richtung. Durch Differenzen in den Mobilitäten der Ionen in den beiden Phasen resultiert eine Sägezahn-artige Flugbahn. Bei geeigneter Einstellung des DMS-Systems werden unterschiedliche Ionen dabei entweder in Richtung einer der Elektrodenplatten abgelenkt (rot) oder werden ähnlich einem Quadrupol-Ionenfilter gerade durch die DMS-Zelle geleitet (grün).

Während die Ionen mit Hilfe des Gasflusses axial durch die DMS-Zelle transportiert werden, bewirkt eine angelegte Trennspannung (separation voltage, SV) gleichzeitig eine radiale Bewegung in Richtung der Elektroden. Hat ein Ion die gleiche Hoch- und Niedrigfeldmobilität, dann resultiert dieses in einer Sägezahn-artigen Flugbahn um die theoretische Zentrallinie der DMS-Zelle ohne eine Berührung der Elektroden. Allerdings zeigen alle Ionen eine gewisse Differenz in den Mobilitäten zwischen hohem und niedrigem Feld, wodurch es zu einer Migration in Richtung einer der Elektroden kommt. Dort werden die Ionen durch Berührung entladen bevor sie zum Ausgang der DMS-Zelle gelangen können. [179, 181]

Eine Kompensationsspannung (compensation voltage, COV) wird an die Elektroden gelegt, um die Flugbahn in Richtung der Achsenmitte zu korrigieren und die Ionen in Richtung des Detektors durch die DMS-Zelle hindurch zu leiten. Wird die Kompensationsspannung auf den geeigneten Wert eingestellt um die spezifische differenzielle Mobilität eines bestimmten Ions auszugleichen, dann kann ein kontinuierlicher Ionenstrahl dieser Spezies die DMS-Zelle zum Detektor ungehindert passieren, während nicht-Zielionen aussortiert werden (s. Abb. 2.10 auf der nächsten Seite). Dieser Modus entspricht vom Konzept her der Einstellung eines Quadrupol-Massenfilters um nur Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladungsverhältnis (m/z) hindurch zulassen. Der Wert der Kompensationsspannung ist ein direkter Ausdruck der differentiellen Mobilität eines Ions unter gegebenen Bedingungen (vor allem der Trennspannung) und das Mittel zur Kontrolle der Ionenflugbahn durch die DMS-Zelle. [179, 181]

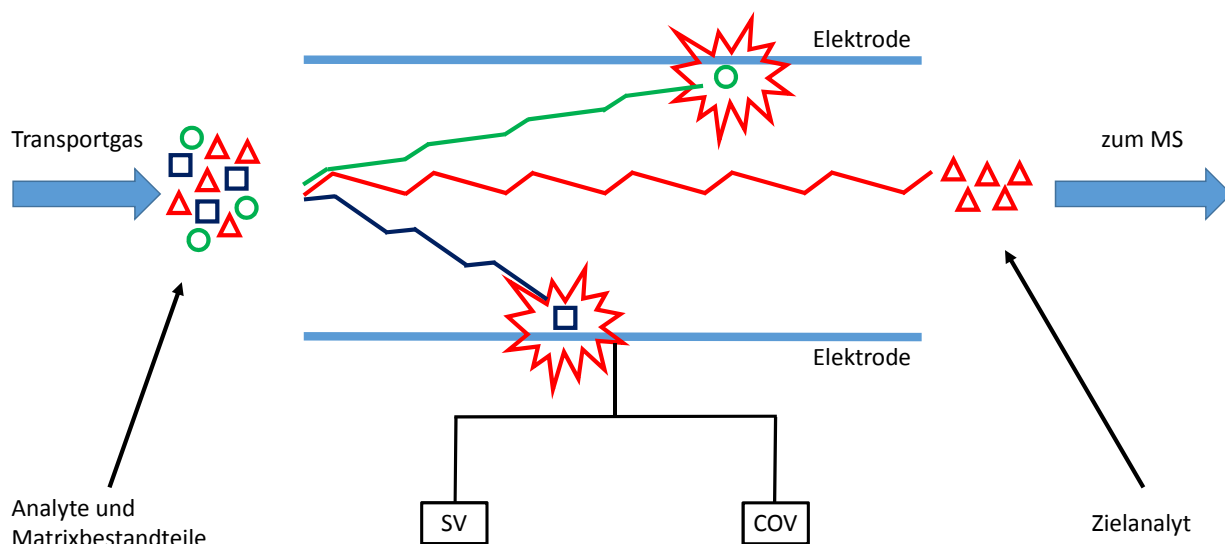


Abb. 2.10.: Darstellung der Funktionsweise der DMS-Zelle des SelexION-Moduls (Abb. in Anlehnung an Sciex). Die Flugbahn des Zielanalyten (dreieckig, rot) wird durch eine passende Kompensationsspannung (COV) korrigiert, um ihn durch die DMS-Zelle zu leiten. Matrixbestandteile und Interferenzen (rund, grün bzw. viereckig, dunkelblau) können die Messzelle nicht passieren, da die Kompensation der Flugbahn bei der jeweiligen Molekülgeometrie nicht ausreicht, sie werden abgelenkt und schließlich an den Elektrodenplatten entladen.

Bei der Verwendung eines DMS-Systems kommt es durch den längeren Flugweg der Ionen bei Atmosphärendruck (s. zu den Abmessungen Abb. 2.8 auf Seite 22) zu Verminderungen der Signalintensität. Trotz absoluter Analytverluste steigt das Signal-Rauschverhältnis durch die Verwendung von DMS üblicherweise an und damit verbessert sich die Nachweisgrenze. Einige Beispiele aus der Literatur zeigen dramatische Verbesserungen durch die stärkere Reduktion des chemischen Hintergrunds im Vergleich zu Verlusten an Analytsignal. Es gibt keine systematischen Untersuchungen über relative Transmissionseffizienzen von DMS-Modulen, aus der verfügbaren Literatur ist aber ein Verlust von 65-92 % der Signalintensität ableitbar. [179]

Ein Differentielles Mobilitätsspektrometrie-Modul selektiert als Ionenfilter anhand von Eigenschaften wie Konformation, Ladungsverteilung oder Polarisierbarkeit [183]. Daher gilt diese Technik als ein zu Flüssigchromatographie (LC) und Massenspektrometrie (MS) orthogonales Verfahren, da differentielle Mobilität auf anderen Prinzipien basiert und beispielsweise nicht mit der Masse eines Ions korreliert [178, 184, 185].

Veröffentlichte Artikel zu einer quantitativen Bestimmung von IPG F_{2α} mittels Differentieller Mobilitätsspektrometrie (DMS) liegen in der verwendeten Literatur nicht vor.

Die DMS-Technik bietet aufgrund anderer Prinzipien im Vergleich zu LC-MS-Verfahren eine andere Art von Selektivität und kann problemlos zusätzlich zur Tandem-MS verwendet werden. Der Zielanalyt IPG F_{2α} soll neben einer Vielzahl von Isomeren aus einer komplexen Matrix bestimmt werden. Viele der Isomere, darunter alle Prostaglandine, haben eine andere räumliche Ausrichtung insbesondere der Kohlenstoffketten (s. hierzu unter 2.5.4 auf Seite 11) als die Isoprostane und daher einen anderen Molekülquerschnitt. Aus diesen Überlegungen heraus wurde das DMS-Modul SelexION als Option zur Selektivitätssteigerung in der vorliegenden Arbeit evaluiert.

3. Zielsetzung

3.1. Hypothese 1

Die selektive quantitative Analyse von Konzentrationsunterschieden an IPG F_{2α} in Urin von Tauchern ist geeignet, um den durch einen Tauchgang erhöhten oxidativen Stress zu erfassen.

Hintergrund

Beim Tauchen mit Schwimmübungen unter Wasser wird eine anstrengende körperliche Aktivität unter hyperbar-hyperoxischen Bedingungen ausgeführt. Der durch die Bewegung erhöhte Energiebedarf bewirkt einen verstärkten Sauerstoffumsatz des Körpers. Bei der forcierten Bildung von Energie in Form von ATP werden in den Mitochondrien durch die Atmungskette verstärkt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erzeugt. Aufgrund der hyperbar-hyperoxischen Bedingungen werden bei Tauchern zusätzlich reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt. Über ROS können im Körper aus ubiquitär vorkommender Arachidonsäure durch nicht-enzymatische oxidative Vorgänge Isoprostane gebildet werden. Aus der Vielzahl von theoretisch möglichen Isoprostanen gilt die Messung des Isomers IPG F_{2α} in Urin als ein nicht-invasives Maß für systemischen oxidativen Stress. IPG F_{2α} ist ein spezifisches und stabiles Produkt der Lipidperoxidation, dessen Werte unter oxidativem Stress unabhängig vom Fettgehalt der Nahrung ansteigen. Auch deswegen wird die Bestimmung von IPG F_{2α} in Urin aktuell als Goldstandard der Analytik von oxidativem Stress *in vivo* angesehen.

Akute Veränderungen von IPG F_{2α}-Konzentrationen in einem Realmodell an Tauchern sind bisher nicht ausreichend untersucht worden. Das Modell des oxidativen Stresses durch Tauchen eignet sich zur Bestimmung von entsprechenden Biomarkern *in vivo* vor und nach einer oxidativen Belastung durch einen Tauchgang, eine mögliche Veränderung ist damit aufzeigbar und der Verlauf des oxidativen Stresses verfolgbar. In der verfügbaren Literatur sind keine selektiven Quantifizierungen von IPG F_{2α} aus Urin von Tauchern beschrieben. Zur Prüfung, ob der allgemein als besonders geeignet angesehene Marker IPG F_{2α} verwendet werden kann, um einen Anstieg des oxidativen Stresses durch einen Tauchgang anzuzeigen, ist die Entwicklung und Validierung einer geeigneten selektiven Messmethode nötig. Mehrere Faktoren erschweren dabei die analytisch komplexe Bestimmung von IPG F_{2α} aus der Matrix Urin:

- a) geringe Konzentration des Zielanalyten

Die zu entwickelnde Methode soll Konzentrationen von IPG F_{2α} aus Urin von Tauchern vor einem Tauchgang, wie auch nach einer hyperbar-hyperoxischen körperlichen Belastung präzise erfassen. Es sind keine Angaben zu Referenzbereichen von IPG F_{2α} bei Tauchern verfügbar, Literaturangaben lassen Werte in einem Bereich von 100 pg IPG F_{2α} pro mg Creatinin vermuten.

Da Tauchen eine Urinverdünnung verursacht, ist von geringeren Messwerten auszugehen. In klinischen Laboren zeigen niedrig konzentrierte Urine Creatininwerte von etwa 250 mg/L, ein Faktor von 4 im Vergleich zu Normalwerten von 1000 mg Creatinin/L. Unter Berücksichtigung dieses Faktors soll die zu etablierende Messmethode eine Quantifizierung von etwa 25 pg IPG F_{2α} pro Milliliter Urin ermöglichen.

b) komplexe biologische Matrix

Urin ist eine komplexe Biomatrix mit einer hohen Salzlast und beinhaltet neben endogenen Ausscheidungsprodukten des Körpers auch Xenobiotika und deren Metabolite. Urin kann in seiner physiologischen Konzentration um etwa den Faktor 20 variieren.

Komplexe Matrices wie Urin verursachen in LC-MS-Methoden oft starke Signalverluste durch Suppressionseffekte in der Ionenquelle des Massenspektrometers. Weiterhin sind zur quantitativen Bestimmung von gering konzentrierten Analyten aus Urin üblicherweise Extraktionsmethoden erforderlich, welche durch die Zusammensetzung und Konzentration des Urins negativ beeinflusst werden können (z. B. Ionenaustausch-SPE durch die Salzlast). Zur sensitiven Bestimmung von IPG $F_{2\alpha}$ aus einer komplexen biologischen Matrix wie Urin ist eine Minimierung der Suppressionseffekte notwendig.

c) Vielzahl an Isomeren

Aufgrund ihrer Struktur sind theoretisch 128 unterschiedliche Isoprostan-Isomere denkbar. Es ist nur sehr wenig darüber bekannt, ob und in welchem Ausmaß unter Bedingungen des oxidativen Stresses weitere Isoprostane neben dem Zielisomer IPG $F_{2\alpha}$ gebildet werden und in der Matrix Urin vorkommen.

Herangehensweise zur Überprüfung der Hypothese

Zur Analyse komplexer Biomatrices wie Urin hat sich LC-MS/MS aufgrund der hohen Selektivität und Sensitivität etabliert. Die Tandem-MS-Kopplung minimiert dabei nicht nur den Untergrund, sondern ist bezogen auf Isoprostane ein wesentlicher Selektivitätsfaktor (s. hierzu Punkt c). Zur Prüfung einer akuten Veränderung der Konzentration des Isomers IPG $F_{2\alpha}$ durch einen Tauchgang sollen Proben desselben Individuums vor und nach einem Tauchgang analysiert werden. Im Rahmen der Methodenentwicklung werden die identifizierten Problemfelder wie folgt bearbeitet:

a) geringe Konzentration des Zielanalyten

Die zu etablierende Messmethode soll eine präzise Quantifizierung ab etwa 25 pg IPG $F_{2\alpha}$ pro Milliliter Urin ermöglichen. Alle Faktoren, die das Messsignal erhöhen oder den Untergrund verringern, wirken sich positiv auf die Sensitivität aus. Neben chromatographischen und massenspektrometrischen Parametern ist hier vorrangig die Matrixsuppression (s. Punkt b) zu berücksichtigen.

Extraktionsverfahren erlauben eine Aufkonzentrierung der Messlösungen und ermöglichen dadurch oft eine höhere Sensitivität. In der verfügbaren Literatur über die Analytik von Isoprostanen ist Festphasenextraktion (SPE) die vorherrschende Aufarbeitungsart aus der Matrix Urin. Dabei werden meist Probenvolumina von einem Milliliter oder mehr extrahiert, nach einem Evaporationsschritt zwecks Lösungsmittelaustausch in einem Volumen von wenigen Mikrolitern gelöst und dann in das Messsystem injiziert.

Es soll eine selektive Festphasenextraktion mit hoher Wiederfindungsrate erarbeitet werden. Mit Hilfe von wässrigen Standardlösungen sollen anhand von Herstellerprotokollen unterschiedliche SPE-Phasen auf ihre Verwendbarkeit hin geprüft werden. Mit den so als geeignet identifizierten SPE-Kartuschen werden die einzelnen Aufarbeitungsschritte anhand von wässrigen Standardlösungen weiter optimiert. Das fertige SPE-Protokoll wird mit Realmatrix auf seine Extraktionsfähigkeit in Form der Wiederfindung geprüft. Gleichzeitig soll das zur Aufarbeitung nötige Probenvolumen abhängig von der Sensitivität des Gesamtverfahrens auf ein Mindestmaß reduziert werden.

b) komplexe biologische Matrix

Um eine ausreichende Sensitivität der Messmethode zu erreichen, ist eine Minimierung von Matrixsuppressionseffekten wesentlich. Dazu wird eine selektive Extraktionsmethode für IPG F_{2α} aus Urin angestrebt, welche die supprimierend wirkenden Matrixbestandteile effektiv entfernt. Aufgrund der Zusammensetzung der Matrix Urin kann beispielsweise eine Ionenaustausch-SPE nicht direkt verwendet werden, zur Extraktion werden daher Umkehr- und Mixed-Mode-Phasen vergleichend evaluiert.

Die zu entwickelnde Festphasenextraktion (SPE, s. Punkt a) soll insbesondere geeignet sein, um supprimierend wirkende Verbindungen zu entfernen. Messungen an Realmatrix sollen dabei Aufschluss über die Ionensuppression geben und die Verwendbarkeit des SPE-Protokolls aufzeigen.

c) Vielzahl an Isomeren

Aufgrund spezifischer Fragmentationen der Regiomerklassen können mittels Tandem-MS 75 % der potentiell möglichen 128 Isoprostan-Isomere selektiv ausgeblendet werden.

Für eine selektive Methode muss die Trennung der übrigen 32 Isomere auf anderem Weg erfolgen, z. B. chromatographisch (s. hierzu auch Hypothese 2). Zunächst wird anhand von verfügbaren Standardsubstanzen die Chromatographie optimiert. Dabei ist die Abtrennung des Analyten IPG F_{2α} von den übrigen Isomeren wesentlich. Bei einer zu starken Überlagerung von Referenzsubstanzen mit dem Zielanalyten muss die Chromatographie verändert oder die Selektivität auf eine andere Art sicher gestellt werden, z. B. über ein entsprechendes Extraktionsverfahren.

Im Rahmen der Validierung soll die Selektivität des Gesamtverfahrens anhand von Realmatrix geprüft werden. Die Chromatogramme von unterschiedlich konzentrierten Urinproben werden hierzu auf zusätzliche Signale in der Nähe des Zielanalyten ausgewertet und geprüft, ob möglicherweise (Teil-) Überlagerungen erkennbar sind. Weiterhin werden Realproben mit potentiell störenden Referenzsubstanzen dotiert und so die Selektivität bezogen auf die bekannten und kommerziell verfügbaren Isomere demonstriert.

3.2. Hypothese 2

Mittels Differentieller Mobilitätsspektrometrie kann IPG F_{2α} selektiv von isobaren Verbindungen gemessen werden.

Im Vergleich zu LC-MS/MS-Messungen wird dabei der Untergrund verringert und folglich verbessert sich das Signal-Rausch-Verhältnis der Messmethode.

Hintergrund

IPG F_{2α} unterscheidet sich von seinen zahlreichen Isomeren durch nur geringe Unterschiede in der räumlichen Ausrichtung der Moleküle. Die Technik der Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS) ist geeignet um isomere Verbindungen aufgrund ihrer räumlichen Struktur voneinander selektiv zu erfassen. Sie verhält sich als Trenntechnik aufgrund anderer physikalischer Prinzipien (räumliche Ausrichtung) orthogonal zur Chromatographie (Polarität) und Tandem-Massenspektrometrie (Masse-Ladungs-Verhältnis) und ist daher als eine zusätzliche Selektivitätsdimension anzusehen. Aufgrund der längeren Flugstrecke der Ionen unter Atmosphärendruck sind deutliche Verluste in der absoluten Intensität der Signale zu erwarten. Dennoch kann der Einsatz der DMS-Technik im Vergleich mit einer LC-MS/MS-Methode zu einer Reduktion des Untergrunds und damit zu einer Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses führen.

In der verfügbaren Literatur ist keine Anwendung einer LC-DMS-MS/MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von IPG F_{2α} beschrieben. Das Isomer IPG F_{2α} soll mit der zu entwickelnden Methode möglichst selektiv aus der theoretischen Vielzahl von Isoprostanen erfasst werden. Für eine selektive Quantifizierung des Zielanalyten müssen nicht über DMS aussortierbare Isomere chromatographisch oder massenspektrometrisch von IPG F_{2α} abgetrennt werden.

Herangehensweise zur Überprüfung der Hypothese

Mittels Tandem-MS wird die Anzahl der für dieses Trennproblem relevanten Verbindungen auf die Isoprostan-Regiomere der 15-Serie eingeschränkt, hierbei handelt es sich um 32 Isomere. Anhand von kommerziell verfügbaren Referenzsubstanzen werden die Einflüsse des DMS-Moduls auf die Selektivität untersucht. Dazu wird das System auf die optimalen Einstellungen des Zielanalyten IPG F_{2α} justiert und dann geprüft, wie groß unter diesen Bedingungen mögliche Interferenzen durch andere Isomere sind und ob diese minimiert werden können. Insbesondere eine Abtrennung der isomeren Prostaglandine ist zu erwarten, da sich hier deutliche Unterschiede in der räumlichen Ausrichtung der Moleküle bezogen auf die jeweiligen Isoprostaglandine ergeben. Durch einen Vergleich von Messungen an Realmatrix mit und ohne DMS soll gezeigt werden, ob systematische Unterschiede in den Ergebnissen vorliegen und ob sich das Signal-Rausch-Verhältnis verändert.

4. Material

Tab. 4.1.: Bezugsquellen von Chemikalien, Geräten und Verbrauchsmaterialien

Firma	Ort	Land
Advanced Chromatography Technologies (ACT)	Aberdeen	Schottland
Agilent Technologies	Waldbronn	Deutschland
Beckman Coulter	Krefeld	Deutschland
Biotage	Uppsala	Schweden
Brand	Wertheim	Deutschland
Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Cayman Chemical	Ann Arbor	USA
Cerilliant	s. Sigma-Aldrich	
Corning	Kaiserslautern	Deutschland
CTC	Zwingen	Schweiz
Dyna-Tek, Inc. (DTI)	Lenexa	USA
Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Fisher Scientific	Schwerte	Deutschland
Fluka	s. Sigma-Aldrich	
Heidolph	Schwabach	Deutschland
Hettich	Tuttlingen	Deutschland
Horizon Technology	Salem	USA
Macherey-Nagel	Düren	Deutschland
MayLab	Wien	Österreich
Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Mettler-Toledo	Gießen	Deutschland
Phenomenex	Aschaffenburg	Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht	Deutschland
Sartorius	Göttingen	Deutschland
Sciex	Darmstadt	Deutschland
Sigma-Aldrich	München	Deutschland
Thermo Scientific Microgenics (TSM)	Passau	Deutschland
VWR	Darmstadt	Deutschland

4.1. Geräte

Tab. 4.2.: allgemeine Laborgeräte

Art	Bezeichnung	Hersteller
Labormixer	Multi Reax	Heidolph
Labormixer	Vortexer VV3	VWR
pH-Meter	SevenCompact	Mettler-Toledo
Pipetten	diverse	Brand
Pipetten	diverse	Eppendorf
Verdampfer mit Inertgasvorrichtung	XcelVap Evaporator	Horizon
Waage	BP 121S	Sartorius
Zentrifuge, kühlbar	Mikro 220R	Hettich
Zentrifuge, kühlbar	Rotina 380R	Hettich

Tab. 4.3.: analytische Systeme

Systemkomponente	Bezeichnung	Hersteller
klinischer Autoanalyser	AU680	Beckman Coulter
binäre UHPLC-Pumpe mit integriertem Entgaser	1290 Infinity	Agilent
kühlbarer Autosampler	HTC-xt PAL	CTC
temperierbarer Säulenofen für bis zu 10 Säulen	MistraSwitch	MayLab
Differential Mobility Spectrometry (DMS)-Modul	SelexION	Sciex
Massenspektrometer	QTRAP 5500	Sciex

4.2. Lösungsmittel

Tab. 4.4.: Lösungsmittel

Name	Reinheitsgrad	Hersteller
2-Propanol	LC-MS, $\geq 99,95\%$	Carl Roth
Acetonitril (ACN)	Ultra LC-MS, $\geq 99,95\%$	Carl Roth
Ethylacetat (EA)	HPLC, $\geq 99,9\%$	Carl Roth
Methanol (MeOH)	Ultra LC-MS, $\geq 99,98\%$	Carl Roth
n-Hexan	for organic trace analysis, $\geq 99,0\%$	Merck
tertiär-Butylmethylether (tBME)	for HPLC, $\geq 99,8\%$	Sigma-Aldrich
Wasser	Ultra LC-MS	Carl Roth

4.3. Chemikalien

Tab. 4.5.: Chemikalien

Name	Reinheitsgrad	Hersteller
Ameisensäure	eluent additive for LC-MS	Fluka
Ammoniaklösung $\geq 25\%$	eluent additive for LC-MS	Fluka
Ammoniumacetatlösung 7,5 M	for molecular biology	Sigma-Aldrich
Ammoniumhydrogencarbonat	eluent additive for LC-MS	Fluka
Glycerol	$\geq 99,5\%$	Sigma-Aldrich
Pyrrolidin	pro analysi, $\geq 99,0\%$	Fluka
Salzsäure 32 %	pro analysi	Merck
Salzsäure 2,0 M	volumetrisch	Fluka

4.4. Verbrauchsmaterial

Tab. 4.6.: Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
Creatinin-Testkit DRI Creatinine-Detect Test	TSM
LC-Säule ACE UltraCore SuperC18 50 x 2,1 mm (2,5 μm)	ACT
LC-Säule ACE UltraCore SuperC18 150 x 2,1 mm (2,5 μm)	ACT
Kunststoff-Röhren (Polypropylen), 15 mL, konisch	Sarstedt
Kunststoff-Röhrchen (Polystyrol), 5 mL	Sarstedt
Glas-Röhrchen (Pyrex), 16 x 100 mm, Borosilikatglas	Corning
SLE-Kartusche ISOLUTE SLE+, 2 mL	Biotage
SPE-Kartusche Bond Elut Certify II, 200 mg, 3 mL, 40 μm	Agilent
SPE-Kartusche Bond Elut Plexa, 60 mg, 3 mL, 45 μm	Agilent
SPE-Kartusche Bond Elut Plexa PAX, 60 mg, 3 mL, 45 μm	Agilent
SPE-Kartusche Chromabond C18ec, 200 mg, 3 mL, 45 μm	Macherey-Nagel
synthetischer Urin Surine Negative Urine Control	Cerilliant
synthetischer Urin Surine Negative Control	DTI
Universalindikatorpapier pH 1-14	Macherey-Nagel
Vials (1,5 mL) incl. Septen (Silikon/Teflon)	Fisher Scientific
Vialeinsätze Verex, 6 mm, konisch, 300 μL , silanisiert	Phenomenex

4.5. Referenzsubstanzen

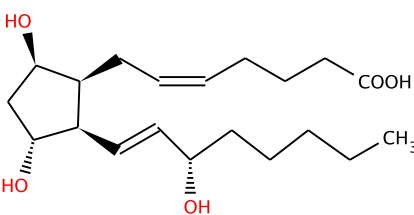
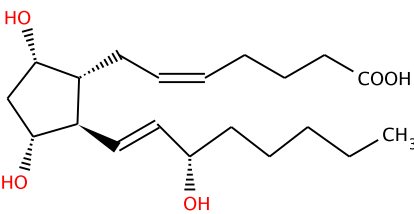
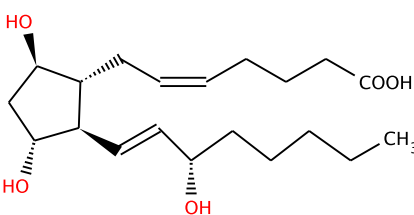
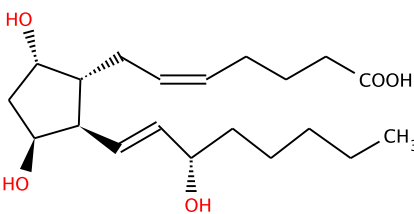
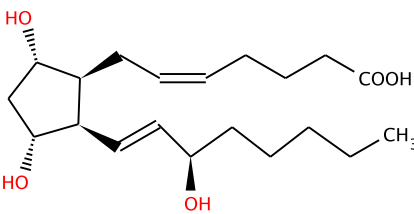
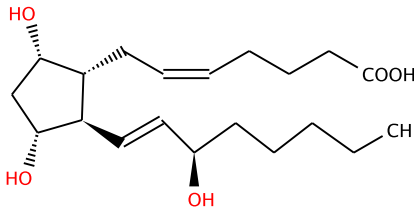
Die in Tabelle 4.7 genannten Referenzsubstanzen wurden von Cayman Chemical bezogen.

Tab. 4.7.: Daten der Referenzsubstanzen

Name	Synonym	CAS-Nr.	Reinheit [%]
8-Isoprostaglandin F _{2α} -D4	IPG F _{2α} -D4	211105-40-7	≥ 99
8-Isoprostaglandin F _{2α}	IPG F _{2α}	27415-26-5	≥ 99
8-Isoprostaglandin F _{2β}	IPG F _{2β} (= 8-iso-9β-PG F _{2α})	177020-26-7	≥ 98
Prostaglandin F _{2α}	PG F _{2α}	551-11-1	≥ 98
Prostaglandin F _{2β}	PG F _{2β} (= 9β-PG F _{2α})	4510-16-1	≥ 99
11β-Prostaglandin F _{2α}	11β-PG F _{2α}	38432-87-0	≥ 98
8-iso-15(R)-Prostaglandin F _{2α} (= 15(R)-Isoprostaglandin F _{2α})	15(R)-IPG F _{2α}	214748-65-9	≥ 98
15(R)-Prostaglandin F _{2α}	15(R)-PG F _{2α}	37658-84-7	≥ 98
5-trans-Prostaglandin F _{2α}	5-trans-PG F _{2α}	36150-01-3	≥ 99
5-trans-Prostaglandin F _{2β}	5-trans-PG F _{2β} (= 5-trans-9β-PG F _{2α})	36150-02-4	≥ 98
ent-Prostaglandin F _{2α}	ent-PG F _{2α}	54483-31-7	≥ 98

Tab. 4.8.: Strukturformeln der Referenzsubstanzen

Name	Strukturformel
IPG F _{2α} -D4	
IPG F _{2α}	

Name	Strukturformel
IPG F _{2β} (8-iso-9β-PG F _{2α})	
PG F _{2α}	
PG F _{2β} (9β-PG F _{2α})	
11β-PG F _{2α}	
15(R)-IPG F _{2α}	
15(R)-PG F _{2α}	

Name	Strukturformel
5-trans-PG F _{2α}	
5-trans-PG F _{2β} (5-trans-9β-PG F _{2α})	
ent-PG F _{2α}	

4.6. Computerprogramme

Tab. 4.9.: verwendete Computerprogramme

Name (Version)	Hersteller	Ort	Land
macOS Sierra (10.12.6)	Apple	Cupertino	USA
Lyx (2.2.3)	GNU General Public License		
JabRef (3.8.2)	GNU General Public License		
Prism 7 for MacOS X (7.0e)	GraphPad Software	La Jolla	USA
MarvinSketch (17.9.0)	ChemAxon	Budapest	Ungarn
Analyst 1.6.3	Sciex	Darmstadt	Deutschland
MultiQuant 3.0.2	Sciex	Darmstadt	Deutschland
Excel für Mac 2011	Microsoft	Redmond	USA
Valistat 2.0	Arvecon	Walldorf	Deutschland

5. Methoden

Die Ergebnisse zu den beschriebenen Versuchen finden sich im Kapitel 6 im jeweils gleich lautenden und identisch durchnummerierten Abschnitt. Wurde Urin für die beschriebenen Versuche eingesetzt, so wurde dieser vor der Verwendung homogenisiert und zur Entfernung von Partikeln anschließend zentrifugiert (z. B. 2000 RCF für fünf Minuten).

5.1. Ermittlung grundlegender Methodenparameter

5.1.1. Substanztuning

Die Ermittlung geeigneter Massenübergänge erfolgte durch direkte Infusion von Einzelsubstanzlösungen über eine Spritzenpumpe in das Massenspektrometer ohne das Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Modul SelexION. Die dabei als Ausgangspunkt verwendeten Standard-Parameter sind in Tabelle A.1 auf Seite 161 beschrieben. Bei jeder Substanz wurde zuerst ein Precursor-Scan aufgenommen. Dazu wurde nach Stabilisierung des Signals der Bereich um die theoretische Massenzahl des Zielanalyten gemessen. Dann folgten jeweils Produktionsscans des gemessenen Precursors über den Massenbereich m/z 40-360 mit verschiedenen Kollisionsenergien, sowie eine Aufzeichnung der Fragmentspektren mit einer Kollisionsenergie von -35 V (s. zu den Massenspektren unter 6.1.1 auf Seite 55). Anhand des Fragmentierungsverhaltens bei unterschiedlichen Kollisionsenergien wurden Übergänge ausgewählt und eine Optimierung der Einstellungen von Declustering Potential (DP), Collision Energy (CE) und Cell Exit Potential (CXP) über die Automatik der Software des Massenspektrometers durchgeführt.

5.1.2. Fließmittel-Modifikatoren

Es wurde der Einfluss von unterschiedlichen Fließmittel-Modifikatoren auf die Signalstärke des Zielanalyten untersucht. Dazu wurden neben den optimierten Massenübergängen Standardparameter für die LC-Anlage und Ionenquelle gewählt, s. hierzu Tabelle A.2 auf Seite 162. Um die Modifikatoren zu testen wurde den Fließmitteln entweder Ameisensäure (FA), Ammoniaklösung (NH_3), Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (NH_4HCO_3) oder Pyrrolidin in unterschiedlichen Mengen zugesetzt und Injektionen (jeweils $n = 3$) einer IPG $\text{F}_{2\alpha}$ -Lösung (100 ng/mL) unter Verwendung eines Standardgradienten auf einer C18-Säule mit hoher pH-Resistenz durchgeführt.

5.1.3. Einfluss des Aufnahmelösungsmittels nach Evaporation

Es wurde die Aufnahme des Rückstands nach einer Evaporation in unterschiedlich starken Lösungsmitteln geprüft. Dazu wurden jeweils 10 μL einer methanolischen Analytlösung (100 ng/mL) für fünf Minuten unter Stickstoff evaporiert und der Rückstand in unterschiedlich starken Lösungsmittelmischungen (0-50 % (v/v) Methanol in Wasser) aufgenommen (jeweils $n = 3$). Zum Vergleich wurden direkte Injektionen von entsprechender Lösung (100 ng/mL IPG $\text{F}_{2\alpha}$ in 10-50 % (v/v) Methanol in Wasser) durchgeführt (jeweils $n = 3$). Da die Lösungen zur direkten Injektion aus einer methanolischen Stammlösung hergestellt wurden, war es nicht möglich eine rein wässrige Vergleichslösung herzustellen. Die als Referenz verwendete IPG $\text{F}_{2\alpha}$ -Lösung zur direkten Injektion hatte einen restlichen Anteil von 1 % Methanol. Zur Messung wurde Methode 1 (s. Tab. A.2 auf Seite 162)

mit den Fließmitteln Wasser (FM A) und Methanol (FM B) verwendet. Beiden Fließmitteln wurde 0,02 % (v/v) Ammoniaklösung als Modifikator zugesetzt.

5.1.4. Ermittlung grundlegender DMS-Parameter - Proof of Principle

Um prüfen zu können, ob die geringen Unterschiede in der Stereochemie der Analyte (s. Tab. 4.8 auf Seite 32) durch die Verwendung des Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Moduls SelexION zu einer höheren Selektivität führen, wurden zunächst dazu nötige Geräteparameter optimiert. Es wurden Lösungen (jeweils 100 ng/mL) der Analyte IPG F_{2α} (als Isoprostan-Marker), PG F_{2α} (als Prostaglandin-Marker) und IPG F_{2α}-D4 (interner Standard, IS) ohne analytische Säule über ein T-Stück direkt in den Fließmittel-Strom vor der Ionenquelle infundiert. Die Messungen wurden mit Methode 1 (s. Tab. A.2 auf Seite 162) durchgeführt, beiden Fließmitteln wurde 0,02 % (v/v) Ammoniaklösung als Modifikator zugesetzt. Abweichend von der genannten Methode wurden nur zwei Massenübergänge (m/z 353-193 und 357-197) aufgezeichnet. Zur Optimierung wurden die Parameter DMS-Temperatur (DT), Separation Voltage (Trennspannung, SV) und Compensation Voltage (Kompensationsspannung, COV) variiert, die Einstellung von DMS Offset (DMO) blieb bei 3 V fixiert, siehe Tabelle 5.1.

Tab. 5.1.: Variablen zur Optimierung der initialen DMS-Parameter

Parameter	Einheit	Minimum	Maximum	Inkrement
DMS-Temperatur (DT)	°C	150	300	75
Trennspannung (SV)	V	0	3000	500
Trennspannung (SV)	V	3000	4000	100
Kompensationsspannung (COV)	V	-20	20	0,5
DMS-Offset (DMO)	V	fixiert bei 3 V		

Wird beim DMS-Modul SelexION eine Trennspannung (Separation Voltage, SV) von 0 V eingestellt, so findet keine Ablenkung statt und alle Ionen fliegen auf einer geraden Bahn durch die DMS-Zelle („transparent mode“, DMSoff). Folglich ergibt sich die größte Signalstärke bei einer Kompensationsspannung (Compensation Voltage, COV) von 0 V, da keine Korrektur der Flugbahn zwischen den Elektrodenplatten nötig ist (s. zu weiteren Erläuterungen unter 2.7 auf Seite 21).

Zur Einstellung der DMS-Temperatur (DT) wurde eine Mischung aus IPG F_{2α}, PG F_{2α} und dem internen Standard IPG F_{2α}-D4 (je 100 ng/mL) infundiert. Die DMS-Zelle wurde so justiert, dass die Flugbahn der Ionen nicht beeinflusst wurde (SV von 0 V). Um zum Vergleich der Signalstärken bei unterschiedlichen Temperaturen ein Ionogramm (Darstellung der COV gegen Signalstärke, s. beispielsweise Abb. 6.6 auf Seite 65) aufzuzeichnen, wurde bei jeder eingestellten Temperatur die Kompensationsspannung schrittweise von -20 V bis +20 V in Inkrementen von 0,5 V abgefahren (n = 6) und die Signale gemessen. Nach jeder Temperaturänderung, low (150 °C), medium (225 °C) und high (300 °C), wurde das Gerät ca. 30 Minuten lang equilibriert.

Zur Optimierung der Trennspannung (SV) mit dem Ziel einer möglichst guten Trennung der Marker-Isomere IPG F_{2α} und PG F_{2α} wurde entsprechend der Optimierung der DMS-Temperatur verfahren. Hierbei wurde allerdings die Trennspannung (SV) inkrementell zwischen 0 V und 4000 V variiert, um zu prüfen, ob die beiden Testsubstanzen unterschiedlich stark auf die Ablenkung durch die angelegte SV reagieren und dadurch separiert werden können. Um die Änderung der Flugbahn auszugleichen wurde die Kompensationsspannung (COV) bei jeder eingestellten SV abgefahren und das entstehende Ionogramm aufgezeichnet (jeweils n = 3 pro geprüfter SV-Einstellung). Bei einer Trennspannung von 4000 V ergab sich die beste Trennung der Markersubstanzen für Isoprostane und Prostaglandine (s. unter 6.1.4 auf Seite 63).

Um das Verhalten jeder verfügbaren Referenzsubstanz (je 100 ng/mL) unter den optimierten Einstellungen des DMS-Moduls zu prüfen, wurden Messungen der Kompensationsspannung (COV) bei einer Trennungsspannung (SV) von 4000 V und einer DMS-Temperatur von 150 °C durchgeführt (jeweils $n = 6$). Diese Messungen entsprechen der Beschreibung der Optimierung der Trennungsspannung, nur war diese hier bei 4000 V fixiert und wurde nicht weiter variiert.

5.2. Optimierung chromatographischer Parameter

Ausgehend von Methode 1 (s. Tab. A.2 auf Seite 162 mit jeweils 0,02 % (v/v) Ammoniaklösung als Fließmittelzusatz) wurden die chromatographischen Parameter (s. Tab. 5.2) variiert, um eine Trennung der beiden DMS-kritischen Isomere IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} (s. unter 6.1.4 auf Seite 63) zu erreichen. Eine Trennung dieser beiden Isomere wurde zunächst unter isokratischen Bedingungen geprüft. Dazu wurde eine Mischung aus IPG F_{2α}, 15(R)-IPG F_{2α} und dem internen Standard IPG F_{2α}-D4 verwendet (jeweils 100 ng/mL) und der Anteil von Fließmittel B schrittweise verändert.

Tab. 5.2.: Variablen zur Optimierung der Chromatographie (isokratisch, alkalisch)

Parameter	Einheit	Minimum	Maximum	Inkrement
Anteil Fließmittel B	%	25	50	variabel
Temperatur	°C	30	50	10
Flussrate	µL/min	200	400	100

Danach wurde bei einem Anteil Fließmittel B von 30 % isokratisch der Temperatureinfluss auf die Trennung bei einer Veränderung von den bisher verwendeten 40 °C auf 30 °C bzw. 50 °C geprüft. Schließlich wurde mit 30 % Fließmittelanteil B bei 50 °C die Flussrate von 300 µL/min auf 200 bzw. 400 µL/min variiert. Bei den beschriebenen Versuchen wurden jeweils mindestens drei Injektionen durchgeführt ($n = 3$) oder bis die Retentionszeit von drei aufeinanderfolgenden Injektionen stabil war.

5.3. Optimierung der Ionenquellenparameter

Als Ausgangsbedingungen für die folgenden Versuche wurden die Einstellungen von Methode 1 (s. Tab. A.2 auf Seite 162) verwendet, beiden Fließmitteln wurde jeweils 0,02 % (v/v) Ammoniaklösung zugesetzt. Abweichend von den angegebenen Parametern wurde isokratisch mit 30 % Anteil Fließmittel B bei einer Flussrate von 400 µL/min gearbeitet, dieses entspricht den bisher optimierten Einstellungen. Zur Prüfung der Quellenparameter wurde eine IPG F_{2α}-Lösung (100 ng/mL) über ein T-Stück in den Fließmittel-Strom infundiert und über eine Kapillare ohne analytische Säule in das Massenspektrometer geleitet. Die Parameter Curtain Gas (CUR), Ion Spray Voltage (IS), Temperature (TEM), Nebulizer Gas (GS1) und Heater Gas (GS2) wurden jeweils inkrementell variiert (je $n = 3$). Die geprüften Parameterveränderungen können Tabelle 5.3 entnommen werden.

Tab. 5.3.: Variablen zur Optimierung der Quellenparameter

Parameter	Einheit	Minimum	Maximum	Inkrement
Curtain Gas (CUR)	psi	20	50	5
Ion Spray Voltage (IS)	V	-4500	-2500	500
Temperature (TEM)	°C	300	700	100
Nebulizer Gas (GS1)	psi	30	80	10
Heater Gas (GS2)	psi	30	80	10

Aus den bisher durchgeführten Optimierungen wurde Methode 2 abgeleitet (s. Tab. A.3 auf Seite 164). Mit dieser Methode wurde ein Vergleich zwischen den ursprünglichen generischen (s. Tab. A.2 auf Seite 162) und den neu optimierten Quellenparametern (s. Tab. A.3 auf Seite 164) durchgeführt. Dazu wurde eine IPG F_{2α}-Lösung (100 ng/mL) jeweils sechs mal pro Parameterset injiziert (n = 6). Abgesehen von den Quellenparametern wurden die übrigen Einstellungen von Methode 2 (s. Tab. A.3 auf Seite 164) verwendet. Um die Variablen gering zu halten wurde das DMS-Modul für diesen Vergleich nicht verwendet und deaktiviert.

5.4. Optimierung der DMS-Parameter

Zur Prüfung und Optimierung der Selektivität mittels Differentieller Mobilitätsspektrometrie (DMS) unter realen chromatographischen Bedingungen wurde eine IPG F_{2α}-Lösung (+ interner Standard, jeweils 100 ng/mL) injiziert (n = 6). Dazu wurde Methode 2 verwendet (s. Tab. A.3 auf Seite 164). Abweichend hiervon wurde jeweils nur ein Massenübergang genutzt (m/z 353-193 für den Zielanalyten, m/z 357-197 für den internen Standard). Die Massenübergänge wurden mehrfach mit unterschiedlichen Einstellungen für die Kompensationsspannung (COV) um das nach den bisherigen Ergebnissen zu erwartende COV-Optimum von IPG F_{2α} einprogrammiert (s. Tab. 5.4). Diese Vorgehensweise ermöglicht eine Bewertung der Auswirkungen einer COV-Veränderung ohne Schwankungen durch unterschiedliche Injektionen (sog. COV-Mapping), da die Daten parallel aus derselben Injektion aufgezeichnet werden.

Tab. 5.4.: Variablen des COV-Mappings (alkalisch)

Parameter	Einheit	Minimum	Maximum	Inkrement
Kompensationsspannung (COV)	V	7	10	0,5

Zur anschließenden Feinabstimmung der DMS-Parameter im Vergleich der unterschiedlichen Referenzsubstanzen wurden in einem ähnlichen Verfahren (DMS-Mapping) Lösungen jeder Einzelsubstanz (+ interner Standard, jeweils 100 ng/mL) gemessen (n = 3). In diesen Versuchen wurde die Kompensationsspannung (COV) feinstufiger variiert (s. Tab. 5.5).

Tab. 5.5.: Variablen des DMS-Mappings (alkalisch)

Parameter	Einheit	Minimum	Maximum	Inkrement
Kompensationsspannung (COV)	V	8	9	0,25

Zusätzlich wurden die Lösungen der einzelnen Analyte (jeweils 100 ng/mL) unter denselben Bedingungen injiziert (n = 3), aber das Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Modul dabei deaktiviert um einen Vergleichswert ohne DMS zu generieren. Hierbei wurde jeweils ein Übergang (m/z 353-193 bzw. 357-197) verwendet, da es ohne DMS keine COV-Variationen gab.

5.5. Chromatographie unter sauren Bedingungen

Im Rahmen des DMS-Mappings als erste lange Versuchsreihe wurden instabile Retentionszeiten festgestellt (s. hierzu unter 6.4 auf Seite 70). Daher wurde die Entscheidung getroffen, eine neue Chromatographie unter sauren Bedingungen zu entwickeln. Basierend auf den Erfahrungen der bisherigen Methodenentwicklung und den substanzabhängigen Parametern der aktuellen Methode 2 sollte geprüft werden, ob damit die nötige Sensitivität für die Aufgabenstellung erreicht werden konnte. Ausgehend von den bisherigen Parametern von Methode 2 (s. Tab. A.3 auf Seite 164) wurden Fließmittel mit einem laborüblichen Zusatz von jeweils 0,1 % (v/v) Ameisensäure verwendet. Die Optimierung der Chromatographie erfolgte mit einer Mischung aus den beiden DMS-kritischen und chromatographisch zu trennenden Isomeren IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} sowie dem internen Standard (jeweils 100 ng/mL) unter isokratischen Bedingungen. Dabei wurde der Anteil von Fließmittel B schrittweise verändert (s. Tab. 5.6).

Tab. 5.6.: Variablen zur Optimierung der Chromatographie (isokratisch, sauer)

Parameter	Einheit	Minimum	Maximum	Inkrement
Anteil Fließmittel B	%	45	70	variabel

Um die Variablen gering zu halten, war das DMS-Modul bei diesen Messungen deaktiviert. Es wurden je drei Injektionen aufgezeichnet sobald die Retentionszeit aufeinanderfolgender Versuche nach der Equilibrierung des Systems mit neuen Bedingungen stabil war (n = 3).

5.6. DMS-Optimierung unter sauren Bedingungen

Analog zur Optimierung der Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS) unter alkalischen Bedingungen (s. unter 5.4 auf der vorherigen Seite) wurde eine IPG F_{2α}-Lösung (+ interner Standard, jeweils 100 ng/mL) unter realen chromatographischen Bedingungen mit Verwendung des DMS-Moduls SelexION injiziert (n = 6). Dabei wurden die Parameter von Methode 3 (s. Tab. A.4 auf Seite 166) verwendet. Abweichend hiervon wurde jeweils ein Massenübergang genutzt (m/z 353-193 für den Zielanalyten, m/z 357-197 für den internen Standard). Die Massenübergänge wurden mehrfach mit unterschiedlichen Einstellungen der Kompensationsspannung (COV) um das nach den bisherigen Ergebnissen zu erwartende COV-Optimum von IPG F_{2α} einprogrammiert (s. Tab. 5.7). Diese Vorgehensweise ermöglicht eine Bewertung der Auswirkungen einer COV-Veränderung ohne Schwankungen durch unterschiedliche Injektionen (sog. COV-Mapping), da die Daten parallel aus derselben Injektion aufgezeichnet werden.

Tab. 5.7.: Variablen des COV-Mappings (sauer)

Parameter	Einheit	Minimum	Maximum	Inkrement
Kompensationsspannung (COV)	V	7	10	0,5

Zur anschließenden Feinabstimmung der DMS-Parameter im Vergleich der unterschiedlichen Referenzsubstanzen wurden in einem ähnlichen Verfahren (DMS-Mapping) Lösungen jeder Einzelsubstanz (+ interner Standard, jeweils 100 ng/mL) gemessen (je n = 3). In diesen Versuchen wurde die Kompensationsspannung (COV) feinstufiger variiert (s. Tab. 5.8 auf der nächsten Seite).

Tab. 5.8.: Variablen des DMS-Mappings (sauer)

Parameter	Einheit	Minimum	Maximum	Inkrement
Kompensationsspannung (COV)	V	8	9	0,25

Zusätzlich wurden die Lösungen der einzelnen Analyte (jeweils 100 ng/mL) unter denselben Bedingungen injiziert ($n = 3$), aber das Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Modul dabei deaktiviert um einen Vergleichswert ohne DMS zu generieren. Hierbei wurde jeweils ein Übergang (m/z 353-193 bzw. 357-197) verwendet, da es ohne DMS keine COV-Variationen gab.

5.7. Optimierung der Festphasenextraktion (SPE)

Alle SPE-Schritte wurden so weit wie möglich per Schwerkraft durchgeführt und erst danach eine Zentrifuge verwendet, wenn nicht anders beschrieben. Sofern nicht anders angegeben erfolgten die Messungen der SPE-Optimierungsversuche mit Methode 3 (s. Tab. A.4 auf Seite 166). Ein dabei verwendeter interner Standard wurde jeweils erst nach der Extraktion aber vor einer Evaporation zugefügt. Dadurch kann die Extraktionseffizienz verglichen und gleichzeitig die Variabilität durch Eindampfen und die Geräteanalytik (Injektion etc.) gering gehalten werden. Es erfolgte generell keine Aufkonzentrierung, die Rückstände wurden nach der Evaporation im gleichen Volumen gelöst wie Matrix zur Extraktion eingesetzt wurde.

5.7.1. Evaporationsverhalten

Zum Testen des Evaporationsverhaltens sowie des Effekts unterschiedlicher Keeper-Substanzen (s. Tab. 5.9) wurden identische Volumina einer IPG F_{2α}-Lösung (50 ng/mL) unter Stickstoff abgedampft (je $n = 3$). Der Rückstand wurde jeweils in 10 % (v/v) Methanol in Wasser aufgenommen und gegen eine Vergleichslösung (50 ng/mL) ohne Abdampfen vermessen.

Tab. 5.9.: Variablen zum Test des Evaporationsverhaltens (angesäuert)

Lösungsmittel	Keeper
Methanol	ohne
Methanol	Wasser
Methanol	Glycerol
Methanol	Ammoniaklösung
Methanol/Ameisensäure (95/5, v/v)	ohne
Methanol/Ameisensäure (95/5, v/v)	Wasser
Methanol/Ameisensäure (95/5, v/v)	Glycerol
Methanol/Ameisensäure (95/5, v/v)	Ammoniaklösung

Da eine Alkalisierung des Extrakts als ein effektiver Keeper funktionierte, wurde in einem weiteren Versuch eine ammoniakalische IPG F_{2α}-Lösung (50 ng/mL) unter Stickstoff bis zur Trockene abgedampft (je $n = 3$). Der Rückstand wurde in 10 % (v/v) Methanol in Wasser aufgenommen und gegen eine entsprechende Vergleichslösung ohne Evaporation gemessen.

5.7.2. SPE-Sorbentiencreening

Ausgewählte SPE-Phasen (s. Tab. 6.7 auf Seite 77) wurden mit Hilfe von Standardprotokollen (s. Tab. 5.10) in Anlehnung an die entsprechenden Herstellerangaben für die jeweilige Retentionsart (Umkehrphase oder Mixed-Mode Anionenaustausch) geprüft (je $n = 3$). Als Probe diente eine wässrige Standardlösung von IPG F_{2α} (50 ng/mL), welche entsprechend des jeweiligen Protokolls extrahiert wurde. Die Extrakte wurden mit internem Standard (50 ng abs.) versetzt, alkalisiert, abgedampft, und dann erfolgte ein Lösungsmittelaustausch. Die Messungen wurden gegen einen entsprechenden nicht extrahierten Vergleichsstandard ausgewertet.

Tab. 5.10.: Protokolle des SPE-Sorbentiencreenings

Protokoll	RP	MM-RP	MM-IA	Volumen [mL]
Retentionsart	RP	RP	Ionenaustausch	
Sorbentien	Plexa und C18ec	Plexa PAX und Certify II	Plexa PAX und Certify II	
Probenvorbereitung	2 % FA	2 % FA	2 % NH ₃	1 + 1
Konditionierung	MeOH			2
Equilibrierung	2 % FA	2 % FA	2 % NH ₃	2
	mit vorbereiteter Probe beladen			
Waschen	10 % MeOH per Schwerkraft, dann Kartusche trocknen (Zentrifuge 5 min bei 3000 RCF)			2
Elution	MeOH	MeOH/FA (95/5) per Schwerkraft dann Zentrifuge 5 min bei 3000 RCF	MeOH/FA (95/5)	2x 1

Alle prozentualen Angaben oder Mischungen wie (95/5) beziehen sich auf (v/v).

5.7.3. SPE-Optimierung: Umkehrphase (RP)

Zuerst wurde eine Waschoptimierung durchgeführt (s. Tab. 5.11 auf der nächsten Seite, je $n = 3$) und dazu ein entsprechendes Profil durch die Verwendung unterschiedlich starker Waschlösungen bei ansonsten gleichen Bedingungen erzeugt. Als Probe wurde eine wässrige Standardlösung von IPG F_{2α} (50 ng/mL) verwendet, welche entsprechend des beschriebenen Protokolls extrahiert wurde. Die Extrakte wurden mit internem Standard (50 ng abs.) versetzt, alkalisiert, abgedampft, und dann erfolgte ein Lösungsmittelaustausch durch Aufnahme des Rückstands in 10 % (v/v) Methanol in Wasser.

Tab. 5.11.: SPE-Protokoll zur Waschoptimierung des Sorbens Plexa

SPE-Schritt	Beschreibung	Volumen [mL]
Probenvorbereitung	Verdünnung mit 2 % FA	1 + 1
Konditionierung	MeOH	2
Equilibrierung	2 % FA	2
	mit vorbereiteter Probe beladen	
Waschen, dabei Waschschritt auffangen	0-100 % MeOH (in 10 %-Schritten) + 2 % FA per Schwerkraft dann Zentrifuge 5 min bei 3000 RCF	0,5

Alle prozentualen Angaben beziehen sich auf (v/v).

Danach wurden unterschiedliche Elutionsmittel und -volumina getestet (s. Tab. 5.12, je $n = 3$). Als Probe wurde eine wässrige Standardlösung von IPG F_{2α} (50 ng/mL) verwendet, welche entsprechend des beschriebenen Protokolls extrahiert wurde. Die Extrakte wurden mit internem Standard (50 ng abs.) versetzt, alkalisiert, abgedampft, und dann erfolgte ein Lösungsmittelaustausch durch Aufnahme des Rückstands in 10 % (v/v) Methanol in Wasser.

Tab. 5.12.: SPE-Protokoll zur Optimierung der Elution des Sorbens Plexa

SPE-Schritt	Beschreibung	Volumen [mL]
Probenvorbereitung	Verdünnung mit 2 % FA	1 + 1
Konditionierung	MeOH	2
Equilibrierung	2 % FA	2
	ohne Waschschritt direkt mit vorbereiteter Probe beladen trocknen 5 min bei 3000 RCF	
Elution	MeOH	jeweils
	oder	1x 0,5
	ACN	2x 0,5
	oder	3x 0,5
	MeOH + 5 % NH ₃ per Schwerkraft dann Zentrifuge 5 min bei 3000 RCF	

Alle prozentualen Angaben beziehen sich auf (v/v).

Unter den bisher optimierten SPE-Bedingungen wurden verschiedene Waschvolumina geprüft (s. Tab. 5.13 auf der nächsten Seite, je $n = 3$). Als Probe wurde eine wässrige Standardlösung von IPG F_{2α} (50 ng/mL) verwendet, welche entsprechend des beschriebenen Protokolls extrahiert wurde. Die Extrakte wurden mit internem Standard (50 ng abs.) versetzt, alkalisiert, abgedampft, und dann erfolgte ein Lösungsmittelaustausch durch Aufnahme des Rückstands in 10 % (v/v) Methanol in Wasser.

Tab. 5.13.: SPE-Protokoll zur Optimierung des Waschvolumens beim Sorbens Plexa

SPE-Schritt	Beschreibung	Volumen [mL]
Probenvorbereitung	Verdünnung mit 2 % FA	1 + 1
Konditionierung	MeOH	2
Equilibrierung	2 % FA	2
	mit vorbereiteter Probe beladen	
		0,5
		1
		2
Waschen	40 % MeOH + 2 % FA	2x 2
		5x 2
		10x 2
	per Schwerkraft, dann Kartusche trocknen (Zentrifuge 5 min bei 3000 RCF)	
Elution	MeOH	2x 0,5
	per Schwerkraft	
	dann Zentrifuge 5 min bei 3000 RCF	

Alle prozentualen Angaben beziehen sich auf (v/v).

5.7.4. SPE-Optimierung: Mixed-Mode (MM)

Für die Mixed-Mode-Säulen wurden zwei unterschiedliche Protokolle mit einer sauren oder einer neutralen Beladung getestet. Zuerst wurde eine Waschoptimierung durchgeführt (s. Tab. 5.14 auf der nächsten Seite, je $n = 3$) und dazu ein entsprechendes Profil durch die Verwendung unterschiedlich starker Waschlösungen bei ansonsten gleichen Bedingungen erzeugt. Als Probe wurde eine wässrige Standardlösung von IPG F_{2α} (50 ng/mL) verwendet, welche entsprechend des jeweiligen Protokolls extrahiert wurde. Die Extrakte wurden mit internem Standard (50 ng abs.) versetzt, alkalisiert, abgedampft, und dann erfolgte ein Lösungsmittelaustausch durch Aufnahme des Rückstands in 10 % (v/v) Methanol in Wasser.

Tab. 5.14.: SPE-Protokoll zur Waschoptimierung des Sorbens Plexa PAX

SPE-Schritt	Protokoll A - sauer	Protokoll B - neutral	Volumen [mL]
Probenvorbereitung	2 % FA	NH ₄ Ac*	1 + 1
Konditionierung		MeOH	2
Equilibrierung	2 % FA	NH ₄ Ac*	2
	mit vorbereiteter Probe beladen		
Waschen 1	5 % NH ₃	NH ₄ Ac*/MeOH (95/5)	2
Waschen 2	0 - 100 % MeOH (in 10 %-Inkrementen) per Schwerkraft, dann Kartusche trocknen (Zentrifuge 5 min bei 3000 RCF)		0,5
Elution	MeOH + 2 % FA per Schwerkraft dann Zentrifuge 5 min bei 3000 RCF		2x 0,5

Alle prozentualen Angaben oder Mischungen wie (95/5) beziehen sich auf (v/v).

* NH₄Ac-Lösung, 50 mM, pH 7

Danach wurden unterschiedliche Elutionsmittel und -volumina getestet (s. Tab. 5.15, je n = 3). Als Probe wurde eine wässrige Standardlösung von IPG F_{2α} (50 ng/mL) verwendet, welche entsprechend des jeweiligen Protokolls extrahiert wurde. Die Extrakte wurden mit internem Standard (50 ng abs.) versetzt, alkalisiert, abgedampft, und dann erfolgte ein Lösungsmittelaustausch durch Aufnahme des Rückstands in 10 % (v/v) Methanol in Wasser.

Tab. 5.15.: SPE-Protokoll zur Optimierung der Elution des Sorbens Plexa PAX

SPE-Schritt	Protokoll A - sauer	Protokoll B - neutral	Volumen [mL]
Probenvorbereitung	2 % FA	NH ₄ Ac*	1 + 1
Konditionierung		MeOH	2
Equilibrierung	2 % FA	NH ₄ Ac*	2
	mit vorbereiteter Probe beladen		
Waschen 1	5 % NH ₃	NH ₄ Ac*/MeOH (95/5)	2
Waschen 2	MeOH per Schwerkraft, dann Kartusche trocknen (Zentrifuge 5 min bei 3000 RCF)		0,5
Elution	MeOH + 2 % FA oder MeOH + 5 % FA per Schwerkraft dann Zentrifuge 5 min bei 3000 RCF		jeweils 1x 0,5 2x 0,5 3x 0,5

Alle prozentualen Angaben oder Mischungen wie (95/5) beziehen sich auf (v/v).

* NH₄Ac-Lösung, 50 mM, pH 7

Unter den bisher optimierten SPE-Bedingungen wurden verschiedene Waschvolumina geprüft (s. Tab. 5.16, je $n = 3$). Als Probe wurde eine wässrige Standardlösung von IPG F_{2α} (50 ng/mL) verwendet, welche entsprechend des jeweiligen Protokolls extrahiert wurde. Die Extrakte wurden mit internem Standard (50 ng abs.) versetzt, alkalisiert, abgedampft, und dann erfolgte ein Lösungsmittelaustausch durch Aufnahme des Rückstands in 10 % (v/v) Methanol in Wasser.

Tab. 5.16.: SPE-Protokoll zur Optimierung des Waschvolumens beim Sorbens Plexa PAX

SPE-Schritt	Protokoll A - sauer	Protokoll B - neutral	Volumen [mL]
Probenvorbereitung	2 % FA	NH ₄ Ac*	1 + 1
Konditionierung		MeOH	2
Equilibrierung	2 % FA mit vorbereiteter Probe beladen	NH ₄ Ac*	2
Waschen 1	5 % NH ₃	NH ₄ Ac*/MeOH (95/5)	2 0,5 1 2
Waschen 2		MeOH	2x 2 5x 2 10x 2
	per Schwerkraft, dann Kartusche trocknen (Zentrifuge 5 min bei 3000 RCF)		
Elution	MeOH + 2 % FA per Schwerkraft dann Zentrifuge 5 min bei 3000 RCF		2x 0,5

Alle prozentualen Angaben oder Mischungen wie (95/5) beziehen sich auf (v/v).

* NH₄Ac-Lösung, 50 mM, pH 7

5.7.5. SPE Vergleich - Umkehrphase (Sorbens Plexa) / Mixed-Mode (Sorbens Plexa PAX)

Es wurde ein Methodenvergleich der optimierten Extraktionen an Realmatrix durchgeführt. Dazu wurde die in Tabelle 6.8 auf Seite 81 beschriebene Umkehrphasen (RP)-Extraktion auf einer Plexa-Säule mit den beiden in Tabelle 6.9 auf Seite 84 beschriebenen Plexa-PAX Mixed-Mode (MM)-Protokollen verglichen (je $n = 6$). Als Probe diente ein mit 10 ng/mL IPG F_{2α} zusätzlich dotierter Realurin (Eigenurin), die Auswertung erfolgte gegen einen nicht extrahierten Vergleichsstandard. Die Extrakte wurden mit internem Standard (10 ng abs.) versetzt, alkalisiert, abgedampft, und dann erfolgte ein Lösungsmittelaustausch durch Aufnahme des Rückstands in 10 % (v/v) Methanol in Wasser. Die Messungen wurden mit Methode 3 (s. Tab. A.4 auf Seite 166) durchgeführt.

5.8. Optimierung der Festphasen-unterstützten Flüssigextraktion (SLE)

Die Festphasen-unterstützte Flüssigextraktion (solid supported liquid extraction bzw. supported liquid extraction, SLE) kann mit einer traditionellen Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) verglichen werden. Beide verwenden Austauschvorgänge zu mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln um wässrige Matrices zu extrahieren. Statt wie bei einer LLE die beiden miteinander nicht mischbaren Phasen zu schütteln, wird die wässrige Phase in der SLE zunächst auf einem inerten Material immobilisiert. Dieses führt zur Ausbildung einer großen Oberfläche. Das organische Lösungsmittel wird danach aufgegeben und fließt zwischen den Partikeln hindurch. Die dabei auftretenden Austauschvorgänge werden durch die große Oberfläche der wässrigen Phase effektiviert. Die Extraktionsrate ist üblicherweise hoch und es können sich keine Emulsionen bilden, da die wässrige Phase auf dem Inertmaterial verbleibt. Die Handhabung erinnert an eine Festphasenextraktion (SPE), zumal das SLE-Material in einem ähnlichen Kartuschenformat verwendet wird. Eine wässrige Probe wird je nach Eigenschaft der zu extrahierenden Substanzen vorbereitet (pH-Einstellung) und auf die trockene Kartusche gegeben. Innerhalb von fünf Minuten zieht die Probe komplett ein und es bildet sich eine große wässrige Oberfläche um die Inertpartikel. Nun kann das mit Wasser nicht mischbare Lösungsmittel aufgegeben werden, welches per Schwerkraft durch die SLE-Kartusche läuft und dabei die Matrix extrahiert.

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle SLE-Schritte per Schwerkraft durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Messung der Optimierungsversuche mit Methode 3 (s. Tab. A.4 auf Seite 166). Ein dabei verwendeter interner Standard wurde jeweils erst nach der Extraktion aber vor einer Evaporation zugefügt. Dadurch kann die Extraktionseffizienz verglichen und gleichzeitig die Variabilität durch eindampfen und die Geräteanalytik (Injektion etc.) gering gehalten werden. Es erfolgte keine Aufkonzentrierung, die Rückstände wurden nach der Evaporation im gleichen Volumen gelöst wie Matrix zur Extraktion eingesetzt wurde.

Zuerst wurde unter vergleichbaren Bedingungen geprüft (je $n = 3$), welche organischen und mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel für eine SLE geeignet waren (s. Tab. 5.17). Als Probe wurde eine wässrige Standardlösung von IPG F_{2α} (50 ng/mL) verwendet, welche entsprechend des beschriebenen Protokolls extrahiert wurde. Die Extrakte wurden mit internem Standard (50 ng abs.) versetzt, alkalisiert, abgedampft, und dann erfolgte ein Lösungsmittelaustausch durch Aufnahme des Rückstands in 10 % (v/v) Methanol in Wasser. Die Auswertung erfolgte gegen einen nicht extrahierten Vergleichsstandard.

Tab. 5.17.: SLE-Protokoll des Lösungsmittelscreenings

SLE-Schritt	Beschreibung	Volumen [mL]
Probenvorbereitung	Verdünnung mit 1 % FA	1 + 1
	mit vorbereiteter Probe beladen	
	5 min warten	
Elution	EA oder tBME oder n-Hexan	2x 5

Alle prozentualen Angaben beziehen sich auf (v/v).

Danach wurden mit dem bisher geeignetsten Lösungsmittel unterschiedliche Elutionsvolumina getestet (s. Tab. 5.18, je $n = 3$). Als Probe wurde eine wässrige Standardlösung von IPG F_{2α} (50 ng/mL) verwendet, welche entsprechend des beschriebenen Protokolls extrahiert wurde. Die Extrakte wurden mit internem Standard (50 ng abs.) versetzt, alkalisiert, abgedampft, und dann erfolgte ein Lösungsmittelaustausch durch Aufnahme des Rückstands in 10 % (v/v) Methanol in Wasser.

Tab. 5.18.: SLE-Protokoll zur Optimierung des Elutionsvolumens

SLE-Schritt	Beschreibung	Volumen [mL]
Probenvorbereitung	Verdünnung mit 1 % FA mit vorbereiteter Probe beladen 5 min warten	1 + 1
Elution	tBME	1x 5 2x 5 3x 5

Alle prozentualen Angaben beziehen sich auf (v/v).

Um die Pufferwirkung der Matrix zu prüfen, wurde der pH-Wert eines Realurins durch verschiedene Säurezusätze modifiziert (s. Tab. 5.19). Dazu wurden je 2 mL eines Urins mit 2 mL eines Modifikators verdünnt und der resultierende Wert mit einem pH-Meter gemessen.

Tab. 5.19.: Variablen zur Prüfung der pH-Einstellung von Urin

geprüfte Modifikatoren
Wasser
1 % Ameisensäure
2 % Ameisensäure
5 % Ameisensäure
10 % Ameisensäure
1N Salzsäure
2N Salzsäure

Alle prozentualen Angaben beziehen sich auf (v/v).

5.8.1. SLE Vergleich - Ethylacetat / tert. Butylmethylether

Es wurde ein Methodenvergleich der optimierten SLE Extraktion durchgeführt. Die beiden geeignet scheinenden Lösungsmittel tert. Butylmethylether (tBME) und Ethylacetat (EA) wurden dabei in ihrer Effizienz an Realmatrix verglichen. Dazu wurde das in Tabelle 6.11 auf Seite 89 beschriebene Extraktionsprotokoll verwendet (je $n = 6$). Als Probe diente ein mit 10 ng/mL IPG F_{2α} zusätzlich dotierter Realurin (Eigenurin), die Auswertung erfolgte gegen einen nicht extrahierten Vergleichsstandard. Die Extrakte wurden mit internem Standard (10 ng abs.) versetzt, alkalisiert, abgedampft, und dann erfolgte ein Lösungsmittelaustausch durch Aufnahme des Rückstands in 10 % (v/v) Methanol in Wasser. Die Messungen wurden mit Methode 3 (s. Tab. A.4 auf Seite 166) durchgeführt.

5.9. Dilute & Shoot

Die bisher durchgeführten Extraktionen ergaben nahezu gleichwertige Ergebnisse: Es lag jeweils eine hohe Extraktionseffizienz vor, in Matrix zeigten sich aber starke Suppressionseffekte, obwohl die Extrakte noch nicht einmal aufkonzentriert wurden. Laut Lambert [186] ist in solchen Fällen eine Direktinjektion oder Verdünnung der Proben besser geeignet, da die Matrixeffekte dabei gegenüber einer Extraktion reduziert werden. Aus diesen Überlegungen heraus wurden Versuche mit einer Direktinjektion von Urin durchgeführt. Diese Vorgehensweise kann je nach der erreichten Sensitivität der Methode mit einem Verdünnungsschritt vor der Injektion erweitert werden (Dilute & Shoot). Die bisher optimierte Methode 3 (s. Tab. A.4 auf Seite 166) wurde unter den neuen Voraussetzungen einer Direktinjektion bzw. eines Dilute & Shoot-Verfahrens in Anlehnung an die bisherigen Parameter überarbeitet.

Die an der Methode vorgenommenen Veränderungen können Tabelle 5.20 entnommen werden. Die Modifikationen betrafen eine Verlängerung der Säule sowie die Verringerung der Temperatur, jeweils zur Verstärkung der Retention. Ein langsamer Gradient hält dabei die Peaks trotz der längeren Säule und Laufzeit schmal. Das organische Fließmittel wurde aus Selektivitätsgründen von Methanol zu Acetonitril gewechselt und der Ameisensäure-Zusatz zur Materialschonung gesenkt. Aus Gründen der Sensitivität einer Direktinjektion nach Verdünnung wurde der Curtain Gas-Wert (CUR) gesenkt. Die Anzahl der Massenübergänge wurden auf jeweils eine Massenspur für den Analyten bzw. den internen Standard reduziert und gleichzeitig die Dwell Time dieser Massenspuren erhöht. Unter den geänderten Bedingungen wurden Proof-of-Concept-Versuche durchgeführt und die Parameter von Methode 4 festgelegt (s. Tab. A.5 auf Seite 168).

Tab. 5.20.: Modifikationen der Methode (Dilute & Shoot)

Parameter	vorher	neu	Grund
Säulenlänge	50 mm	150 mm	Retention
Temperatur	50 °C	30 °C	Retention
Gradient	isokratisch	0,6 % pro min	Peakbreiten
Fließmittel B	Methanol	Acetonitril	Selektivität
Fließmittelzusatz	0,1 % FA	0,01 % FA	Materialschonung
Curtain Gas (CUR)	40 psi	20 psi	Sensitivität
Anzahl MRM	10	2	Sensitivität
Dwell Time (IPG F _{2α})	50 ms	500 ms	Sensitivität
Dwell Time (IS)	50 ms	250 ms	Sensitivität

Alle prozentualen Angaben beziehen sich auf (v/v).

In den Proof-of-Concept-Versuchen war mit einer Direktinjektion bereits ab dem ersten Versuch mit einem nicht dotierten Testurin (ein Eigenurin) der Zielanalyt IPG F_{2α} auf endogenem Niveau deutlich messbar. Daher wurde mit Methode 4 eine Validierung durchgeführt, um die Anwendbarkeit des Verfahrens für die vorliegende Aufgabe zu evaluieren.

5.9.1. Injektionsvolumen

Eine Volumenüberladung der analytischen Säule kann zu stark deformierten Peaks führen [187]. Um zu prüfen, welches Volumen sich unter den in Methode 4 (s. Tab. A.5 auf Seite 168) angegebenen Bedingungen maximal injizieren ließ, wurde jeweils die gleiche absolute Menge IPG F_{2α} in unterschiedlichen Volumina 20 % (v/v) Acetonitril in Wasser als Lösungsmittel getestet (n = 3, s. Tab. 5.21 auf der nächsten Seite).

Tab. 5.21.: Prüfung des maximalen Injektionsvolumens

Konzentration [ng/mL]	Injektionsvolumen [μ L]	inj. Menge abs. [pg]
100	1	100
20	5	100
10	10	100
5	20	100
2	50	100

5.10. Validierung

Zur Validierung wurde die finale Methode 4 (s. Tab. A.5 auf Seite 168) verwendet. Die Probenvorbereitung bestand aus einer Verdünnung der Urinproben im Verhältnis 1 + 1 mit einer Lösung des internen Standards (2 ng/mL in 20 % (v/v) Acetonitril in Wasser). Die IS-Lösung wurde arbeitstäglich frisch angesetzt und vor ihrer Verwendung auf eventuelle Verunreinigungen durch den oder Zersetzung zum Zielanalyten überprüft.

5.10.1. Stabilität der Proben

Es wurde mit Realmatrix gearbeitet, dazu wurde ein Urin verwendet, welcher in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Die IPG F_{2 α} -Konzentration von Urin Nr. 17 (s. Tab. 5.23 auf Seite 51) wurde per Standardaddition bestimmt (n = 3). Dabei wurden die für jeden Level verwendeten Additionslösungen individuell und unabhängig voneinander angesetzt. Für die folgenden Stabilitätsuntersuchungen ergab sich aus dieser Standardaddition eine endogene IPG F_{2 α} -Konzentration des eingesetzten Urins von 154 pg/mL.

Stabilität der Proben im Autosampler

Geprüft wurde die Stabilität von aufgearbeiteten Proben während der Lagerung bei 10 °C im Autosampler. Der Test wurde über 48 Stunden durchgeführt, damit auch lange Sequenzen (z. B. während der Validierung) von den Versuchen abgedeckt werden. Die Stabilitätsproben wurden auf zwei Konzentrationsniveaus, niedrig und hoch, mit je drei Ansätzen (je n = 3) in Intervallen von jeweils vier Stunden gemessen. Als Realmatrix wurde Urin Nr. 17 verwendet (vgl. Tab. 5.23 auf Seite 51). Die endogene Konzentration des Urins wurde als Level niedrig (154 pg/mL) benutzt. Für den Level hoch (2154 pg/mL) wurde dieser Urin zusätzlich mit 2 ng/mL IPG F_{2 α} aufgestockt.

Einfrier-/Auftau-Stabilität

Die Stabilität des Zielanalyten in Matrix bezüglich mehrerer Einfrier- und Auftauvorgänge wurde geprüft. Die Messungen hierzu erfolgten mit jeweils drei Messungen (je n = 3) auf zwei Konzentrationsniveaus (niedrig und hoch). Als Realmatrix wurde Urin Nr. 17 verwendet (vgl. Tab. 5.23 auf Seite 51). Die endogene Konzentration des Urins wurde als Level niedrig (154 pg/mL) benutzt, für den Level hoch (2154 pg/mL) wurde dieser Urin zusätzlich mit 2 ng/mL IPG F_{2 α} aufgestockt. Aus einem dotierten homogenen Urinpool wurden Aliquote in Glasvials überführt und entsprechend gelagert. Ein Zyklus bestand aus mindestens 20 Stunden einfrieren bei unter -20 °C und anschließend mindestens einer Stunde auftauen bei Raumtemperatur. Die Vergleichsproben wurden am Tag der Messung aus demselben Urin frisch hergestellt. Nach drei Einfrier-/Auftauzyklen wurden die Vergleichs- und Stabilitätsproben gemeinsam in einer Sequenz gemessen.

5.10.2. Selektivität

Zur Prüfung auf eventuell nötige Justierungen der Einstellungen des Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Moduls SelexION durch die Veränderungen der Methode (s. unter 5.9 auf Seite 48) wurde das DMS-Mapping wiederholt (s. unter 5.6 auf Seite 39). Dazu wurden jeweils Lösungen jeder Einzelsubstanz (+ interner Standard, jeweils 100 ng/mL) je drei mal gemessen (je $n = 3$). Dabei wurde die Kompensationsspannung (COV) feinstufig ausgehend vom für IPG F_{2α} zu erwartenden Maximum variiert (s. Tab. 5.22).

Tab. 5.22.: Variablen zur Validierung der Selektivität des DMS-Moduls

Parameter	Einheit	Minimum	Maximum	Inkrement
Kompensationsspannung (COV)	V	8	9	0,25

Zusätzlich wurden die Lösungen der einzelnen Analyte (jeweils 100 ng/mL) unter denselben Bedingungen injiziert (je $n = 3$), aber das DMS-Modul SelexION dabei deaktiviert um einen Vergleichswert ohne DMS zu generieren.

Selektivität in Realmatrix

Um zu prüfen, ob in Realmatrix zusätzliche Signale im Chromatogramm erkennbar waren, wurden 20 unterschiedliche Realurine getestet (s. Tab. 5.23 auf der nächsten Seite). Dabei wurden vor allem Proben mit geringem Creatiningehalt verwendet, da diese einen entsprechend geringen Gehalt an IPG F_{2α} aufweisen und damit die Grenzen des Verfahrens aufzeigen können sollten. Die Urine wurden unter Zusatz des internen Standards direkt injiziert, sowie 1 + 1 bzw. 1 + 4 mit 20 % (v/v) Acetonitril in Wasser verdünnt. Weiterhin wurden zwei Urine (Nr. 2, niedriges Creatinin und Nr. 20, hohes Creatinin) undotiert, sowie mit einer Mischung (jeweils 1 ng/mL) des Zielanalyten IPG F_{2α} und den drei potentiell störenden Isomeren 15(R)-IPG F_{2α}, IPG F_{2β} und 11β-PG F_{2α} dotiert und nach Aufarbeitung (Verdünnung 1 + 1 mit IS-Lösung) sowohl mit als auch ohne Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS) gemessen. Zum Vergleich wurde eine entsprechende Standardmischung der Analyten (1 ng/mL) sowohl mit wie auch ohne DMS geprüft.

Der Creatiningehalt der Urinproben wurde mit einer kinetischen Jaffe-Methode (DRI Creatinine-Detect Test) auf einem klinischen Autoanalyzer (AU680) bestimmt. Das validierte Verfahren wurde im Labor der Bioscientia Ingelheim in der Routine zur Bestimmung der Creatininwerte von Urinen in der toxikologischen Analytik eingesetzt.

Tab. 5.23.: Creatininkonzentrationen der zur Validierung verwendeten Urinproben

Urin Nr.	Creatinin [mg/L]
1	587
2	137
3	297
4	538
5	345
6	306
7	145
8	491
9	1165
10	1901
11	308
12	190
13	1026
14	478
15	2193
16	742
17	339
18	669
19	590
20	2689
Mixurin, sehr hohes Creatinin	4302
Surine (Charge 72112)	805
Surine (Charge FN06221602)	789

Der Mixurin wurde wegen Mangel an Material aus mehreren Urinen mit jeweils sehr hohen Creatiningehalten gemischt. Die beiden synthetischen Urine wurden erst zu einem späteren Zeitpunkt der Validierung verwendet und zwecks Vollständigkeit in der Tabelle mit aufgeführt.

5.10.3. Linearität

Die Prüfung der Linearität wurde in Matrix durchgeführt. Dazu wurden Urin Nr. 2 bzw. zum Vergleich ein synthetischer Urin (Surine) jeweils mit 0,1 bzw. 0,5 ng/mL und 1-10 ng/mL IPG F_{2α} in insgesamt 12 Konzentrationsniveaus aufdotiert (je n = 3). Dabei wurden die für jeden Level verwendeten Additionslösungen individuell und unabhängig voneinander angesetzt.

Vergleich zwischen mehreren Matrices

Aufgrund der Tatsache, dass bei hochkonzentrierten Urinen Matrixeffekte vorlagen (s. unter 6.10.5 auf Seite 107), wurden in einer weiteren Versuchsreihe mehrere Matrices miteinander verglichen. Dazu wurden folgende in ausreichender Menge verfügbaren Matrices verwendet (s. Tab. 5.23):

1. Surine (Creatinin 805 mg/L)
2. Urin Nr. 2 (Creatinin 137 mg/L)
3. Urin Nr. 10 (Creatinin 1901 mg/L)
4. Mixurin (Creatinin 4302 mg/L)

Alle Matrices wurden in dem für die Routineverwendung angedachten Bereich von 25-5000 pg/mL IPG F_{2α} jeweils auf 8 Konzentrationsniveaus aufdotiert und gemessen (je n = 6). Es stand keine

Real-Leermatrix zur Verfügung. Um Werte unterhalb der endogenen Konzentration des jeweiligen Urins zu erreichen, wurden Verdünnungen mit Surine vorgenommen, um die Realmatrix möglichst beizubehalten. Die endogenen Konzentrationen der unterschiedlichen Urine waren prinzipiell bekannt. Für diese Versuchsreihe wurden diese endogenen Gehalte mit den übrigen Proben in einer Sequenz dennoch erneut gemessen. Dazu wurden die jeweiligen Matrices zusätzlich zu den beschriebenen Konzentrationen undotiert analysiert (je $n = 6$).

5.10.4. Präzision und Richtigkeit

Die Prüfungen auf Präzision und Richtigkeit wurden parallel durchgeführt. Als Matrices wurden zwei Urine verwendet, welche in ausreichender Menge zur Verfügung standen und unterschiedlich stark konzentriert waren (s. Tab. 5.23 auf der vorherigen Seite):

1. Urin Nr. 2 (Creatinin 137 mg/L)
2. Urin Nr. 10 (Creatinin 1901 mg/L)

Beide Urine wurden nativ wie auch jeweils zusätzlich mit IPG F_{2α} dotiert gemessen. Dabei wurde Urin Nr. 2 mit 200 pg/mL und Urin Nr. 10 mit 2000 pg/mL aufgestockt. Da für eine Bestimmung der Präzision der exakte Zielwert nicht wichtig ist, wurde auf eine erneute Bestimmung der endogenen Grundniveaus verzichtet. Die Urine wurden jeweils als homogener Pool angesetzt, anschließend in Glasvials aliquotiert und bei ≤ -20 °C bis zur Messung gelagert. Zur Auswertung wurde an jedem Messtag eine Kalibration in Surine in dem für die Routineverwendung angedachten Bereich von 25-5000 pg/mL IPG F_{2α} zusammen mit den Proben gemessen. Die Proben wurden mit je sechs separaten Aufarbeitungen geprüft (je $n = 6$). Die Messungen erfolgten an acht unterschiedlichen Tagen über etwa einen Monat hinweg. An jedem Messtag wurden die Kalibration und die interne Standard-Lösung frisch hergestellt.

5.10.5. Matrixeffekt

Zum Test auf Vorkommen und Ausmaß von Matrixeffekten wurden Kalibrationen in unterschiedlichen Urinen angesetzt und die Steigungen der resultierenden Geraden miteinander verglichen. Folgende in ausreichender Menge verfügbare Matrices wurden für die beschriebenen Versuche verwendet (s. Tab. 5.23 auf der vorherigen Seite):

1. Wasser
2. Surine (Creatinin 805 mg/L)
3. Urin Nr. 2 (Creatinin 137 mg/L)
4. Urin Nr. 10 (Creatinin 1901 mg/L)
5. Mixurin (Creatinin 4302 mg/L)

Neben Wasser und Surine als Vergleich bzw. Leermatrix wurden Urine unterschiedlicher Konzentrationen verwendet, da der Matrixeffekt vermutlich mit zunehmender Konzentration interferierender Substanzen ansteigt. Creatinin wird dabei als Marker der Urinkonzentration angesehen. Als konzentrierteste Matrix wurde eine Mischung aus verschiedenen Urinen mit extrem hohen Creatininwerten hergestellt, da von keinem einzelnen Urin selbst eine ausreichende Menge verfügbar war. Die Matrices wurden jeweils mit fünf unterschiedlichen Konzentrationen aufgestockt (250-5000 pg/mL) gemessen (je $n = 3$).

5.10.6. Grenzwerte: Nachweisgrenze / Bestimmungsgrenze

Zur Prüfung der analytischen Grenzwerte des Verfahrens (Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze) wurden Kalibrationen in einem niedrigen Messbereich (ca. 5-150 pg/mL) in unterschiedlichen Urinen angesetzt und gemessen ($n = 6$). Folgende in ausreichender Menge verfügbare Matrices wurden dazu verwendet (s. Tab. 5.23 auf der vorherigen Seite):

1. Surine (Creatinin 805 mg/L)
2. Urin Nr. 2 (Creatinin 137 mg/L)
3. Urin Nr. 10 (Creatinin 1901 mg/L)
4. Mixurin (Creatinin 4302 mg/L)

Es stand keine Real-Leermatrix zu Verfügung. Um Werte unterhalb der endogenen Konzentration des jeweiligen Urins zu erreichen, wurden Verdünnungen mit Surine vorgenommen um möglichst viel Realmatrix beizubehalten. Zur exakten Festlegung der nativen Konzentrationen für diese Versuchsreihe wurden die jeweiligen Urine undotiert in der gleichen Sequenz mit gemessen (je $n = 6$).

5.10.7. Verschleppung

Aus bereits durchgeführten Versuchen wurden Daten zur Beurteilung einer potentiellen Verschleppung herangezogen. Dazu wurden aus den Linearitätstests bzw. den Vergleichen verschiedener Matrices (s. unter 5.10.3 auf Seite 51 bzw. unter 6.10.3 auf Seite 102) die jeweils maximalen Dotierungen verwendet, also Urin Nr. 2 (niedriges Creatinin) mit einer Dotierung von 10.000 pg/mL bzw. der Mixurin (extrem hohes Creatinin) mit einer Aufstockung von 5000 pg/mL IPG $F_{2\alpha}$.

5.11. Bestimmung von IPG $F_{2\alpha}$ in Urinen von Tauchern vor und nach einem Tauchgang

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 234 Urinproben von Tauchern untersucht ($n = 234$). Dabei handelte es sich um 78 Sets bestehend aus jeweils drei Proben, welche vor, direkt nach und sechs Stunden nach einem Tauchgang genommen wurden. Die Gewinnung der Proben wurde vollständig anonymisiert durchgeführt, eine Rückverfolgbarkeit oder Zuordnung der Ergebnisse zu individuellen Tauchern ist nicht möglich, lediglich die jeweils drei Proben eines Sets waren entsprechend ihrer Zusammengehörigkeit markiert.

Die Urinproben stammten von trainierten Berufstauchern der deutschen Marine, welche sich freiwillig an diesem Projekt beteiligten. Die Bundeswehrtaucher waren alle männlich und gesund, sie unterliegen einer regelmäßigen Kontrolle und Tauchfreigabe durch das Schiffsfahrtmedizinische Institut der Marine. Die Tauchgänge entsprachen den Vorgaben der Deutschen Marine und fanden im Rahmen des normalen Dienstbetriebs üblicherweise abends oder nachts statt. Sie wurden mit einem Kreislauftauchgerät und reinem Sauerstoff durchgeführt und beinhalteten bei einer Dauer von 60-90 Minuten starke körperliche Beanspruchungen.

Dieses Projekt wurde unter dem Ethikvotum AZ: D511/13 mit Bezug auf AZ: A120/13 und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Taucher haben ihre Einwilligung zur freiwilligen Teilnahme gegeben und einer nicht-invasiven und anonymen Probennahme zugestimmt.

Die untersuchten Urinproben sowie zur Auswertung verwendete Daten über die jeweiligen Tauchgänge wurden freundlicherweise durch Dr. Wataru Kähler vom Schiffsfahrtmedizinischen Institut der Marine zu Verfügung gestellt.

Der Creatiningehalt der Urinproben wurde mit einer kinetischen Jaffe-Methode (DRI Creatinine-Detect Test) auf einem klinischen Autoanalyzer (AU680) ermittelt. Dieses validierte Verfahren wurde im Labor der Bioscientia Ingelheim in der toxikologischen Routine zur Bestimmung der Creatininwerte von Urinen eingesetzt.

Zur Bestimmung von IPG $F_{2\alpha}$ wurden die Proben entsprechend der Vorgehensweise der Validierung 1 + 1 mit einer Lösung des internen Standards verdünnt und mit der finalen Methode 4 (s. Tab. A.5 auf Seite 168) gemessen. Die interne Standard-Lösung (2 ng/mL IPG $F_{2\alpha}$ -D4 in 20 % (v/v) Acetonitril in Wasser) wurde arbeitstäglich frisch angesetzt und vor der Verwendung auf Freiheit von Kontaminationen durch oder Abbau zu IPG $F_{2\alpha}$ geprüft. Es wurden arbeitstäglich sechs Kalibratoren

im Bereich von 25-5000 pg/mL IPG $F_{2\alpha}$ in Surine angesetzt, zur Prüfung der Kalibratormatrix und des internen Standards wurde ein Nullkalibrator verwendet. Zur Qualitätskontrolle wurden arbeitstäglich Qualitätskontrollproben (QC) auf zwei Konzentrationsniveaus hergestellt (100 bzw. 1000 pg/mL in Surine) und beide jeweils zu Beginn, in der Mitte und am Ende jeder Sequenz analysiert.

Die insgesamt 234 Proben wurden in drei Sequenzen mit je 78 Proben (entsprechend je 26 Sets) gemessen. Ein Probenet bestand jeweils aus je einer Probe vor (t_0) und direkt nach einem Tauchgang (t_1), sowie einer weiteren Probe sechs Stunden später (t_2). Diese jeweils drei Urine eines Sets wurden zusammenhängend gemessen, um möglichst gleichartige Gerätebedingungen zu ermöglichen und Variabilitäten in der Geräteperformance zu minimieren.

5.12. Bestimmung von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ als potentieller alternativer Biomarker

Es wurde eine Kalibration von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ erstellt und damit eine retrospektive Auswertung der vorhandenen Datensätze durchgeführt. Der Ansatz der Kalibration (incl. internem Standard) und die Aufarbeitung entsprach der Vorgehensweise zur Bestimmung von IPG $F_{2\alpha}$ in den Proben, s. hierzu unter 5.11 auf der vorherigen Seite.

5.13. Vergleich von IPG $F_{2\alpha}$ -Messungen mit und ohne Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS)

Die aufgearbeiteten Proben der IPG $F_{2\alpha}$ -Messung (s. unter 5.11 auf der vorherigen Seite) wurden reanalysiert, indem aus denselben Vials eine zweite Injektion in derselben Reihenfolge wie zuvor mit einem leicht veränderten Messsystem durchgeführt wurde. Das DMS-Modul SelexION wurde dazu vom Massenspektrometer entfernt und dadurch die Standardkonfiguration einer Sciex QTRAP 5500 hergestellt. Die LC-MS/MS-Methode wurde nicht verändert, durch das fehlende SelexION ergab sich eine automatische Änderung der Cycle Time, da nun zwischen den MRM-Transitionen anstelle von bisher 20 Millisekunden nun nur noch 5 Millisekunden Zeit zum Umschalten nötig waren. Die DMS-Zelle stellt eine Verlängerung des Flugweges der Ionen um 30 Millimeter bei Atmosphärendruck dar (s. Abb. 2.8 auf Seite 22). Dieses bewirkt eine Verringerung der Signalintensität (s. unter 2.7 auf Seite 21) bei der Verwendung des SelexION-Moduls, ein Nachteil der durch eine noch stärkere Reduktion des Untergrundes kompensiert werden kann. Als Resultat aus einer geringeren Signalstärke und noch deutlicher reduziertem Untergrund steigt das Signal-Rausch-Verhältnis an. Zusammen mit der Bereinigung von zusätzlichen Signalen durch isobare Störungen ergab sich ein deutlich einfacheres Chromatogramm, welches den Peak des Zielanalyten besser und leichter integrieren ließ (s. unter 7.2 auf Seite 144).

6. Ergebnisse

Die Beschreibung zu den durchgeführten Versuchen finden sich im Kapitel 5 im jeweils gleich lautenden und identisch durchnummerierten Abschnitt.

Bei Abbildungen und Tabellen wurden Ergebnisse von Mehrfachmessungen so weit möglich im Format Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) dargestellt. Die quantitative Auswertung erfolgte, sofern nicht anders angegeben, über die Peakflächen der Massenübergänge m/z 353-193 (für den Zielanalyten IPG F_{2 α}) bzw. m/z 357-197 (für den deuterierten internen Standard IPG F_{2 α} -D4).

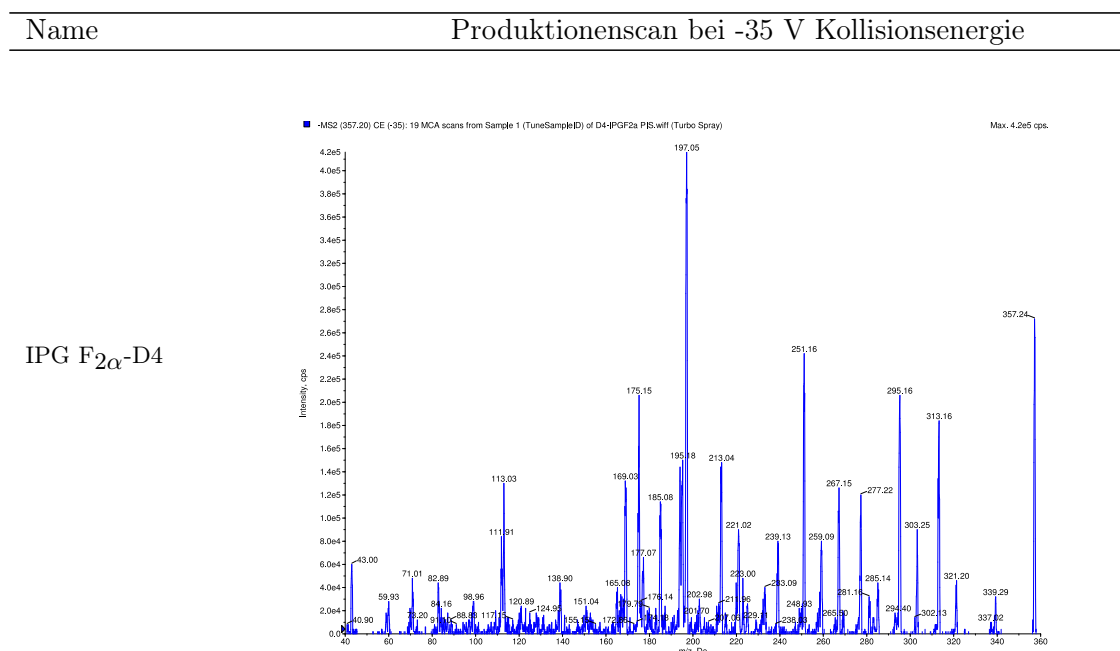
6.1. Ermittlung grundlegender Methodenparameter

6.1.1. Substanztuning

Das Precursorion der Isoprostane wurde mit m/z 353 (M-H)⁻ im negativen Modus gemessen, für den vierfach deuterierten internen Standard entsprechend m/z 357 (M-H)⁻.

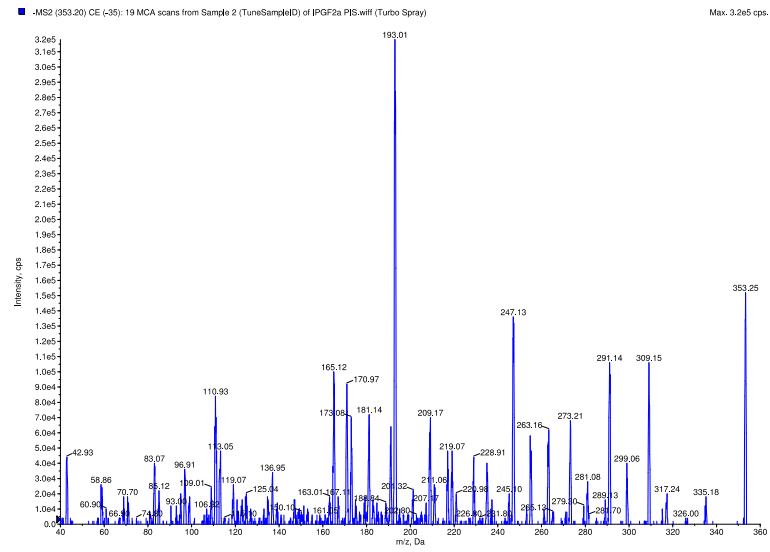
In der folgenden Tabelle 6.1 werden zum Vergleich die Produktionenscans der verfügbaren Referenzsubstanzen bei einer Kollisionsenergie von -35 V dargestellt.

Tab. 6.1.: Produktionenscans der verwendeten Referenzsubstanzen

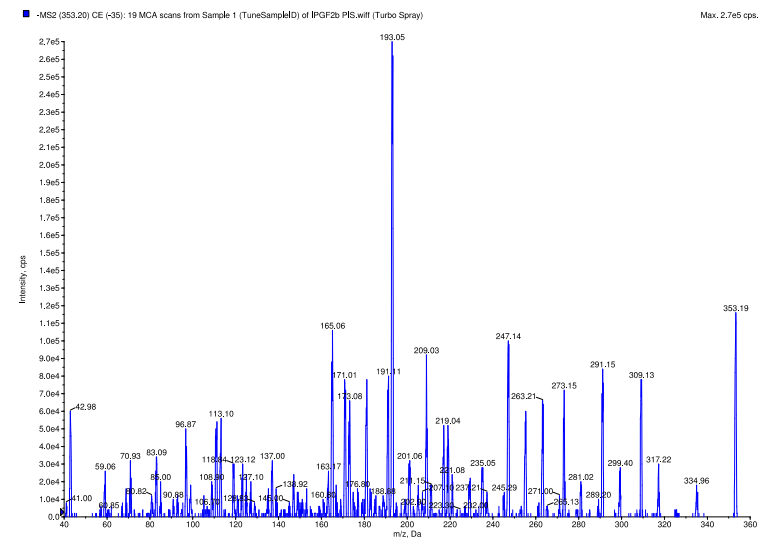


Name	Produktionenscan bei -35 V Kollisionsenergie
------	--

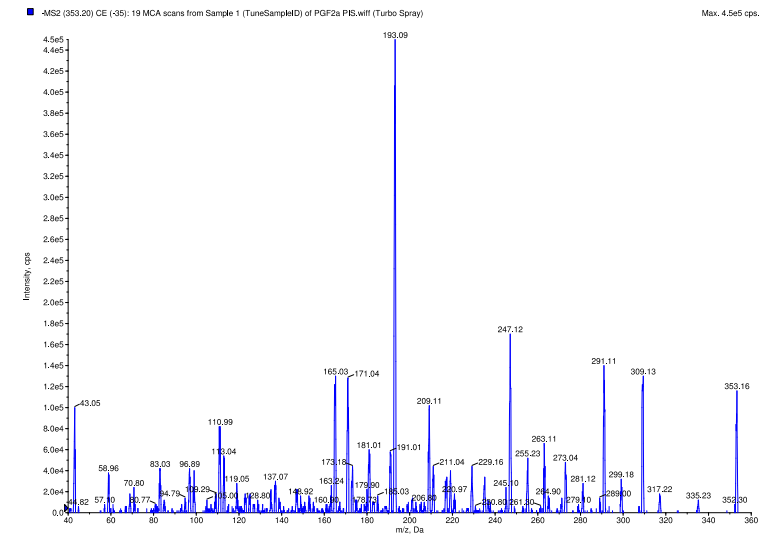
IPG F_{2α}



IPG F_{2β}
(8-iso-9β-PG F_{2α})

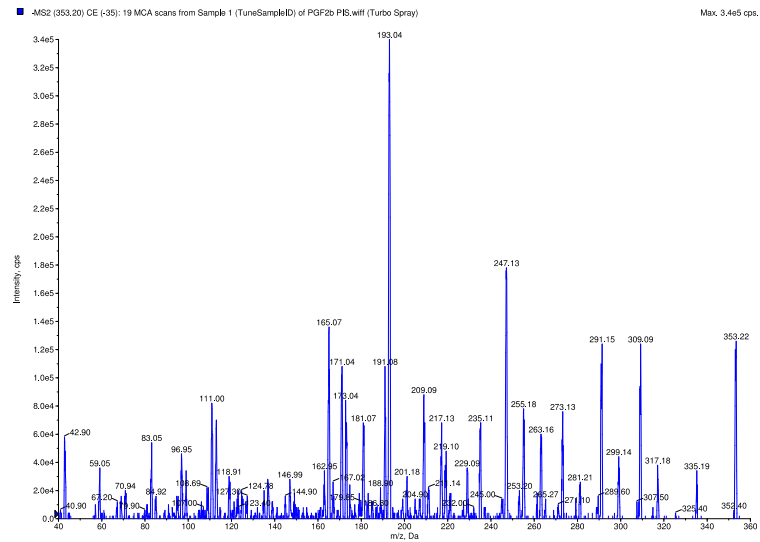


PG F_{2α}

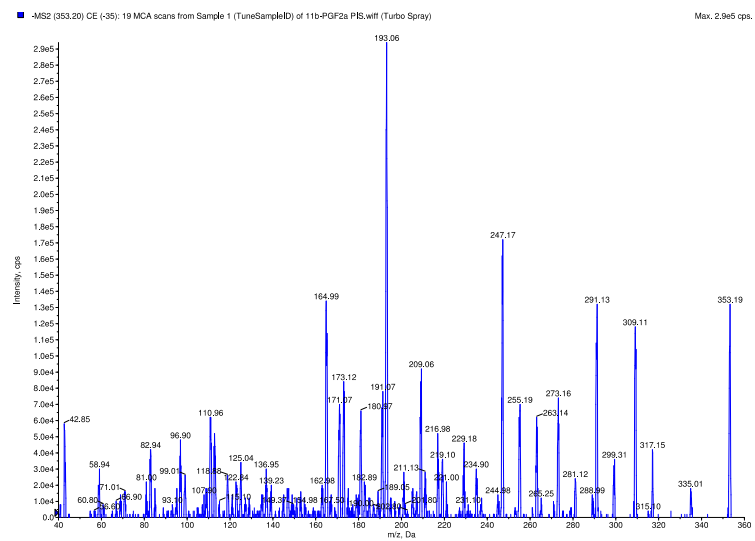


Name	Produktionenscan bei -35 V Kollisionsenergie
------	--

PG F₂ β
(9 β -PG F₂ α)

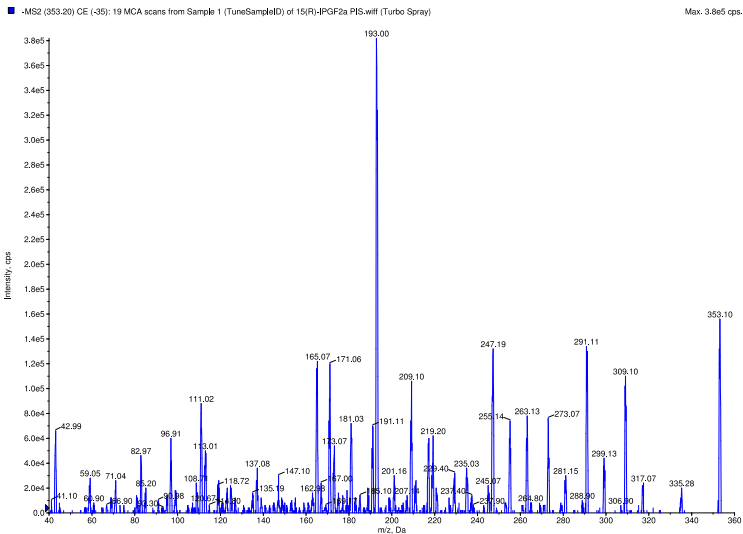


11 β -PG F₂ α

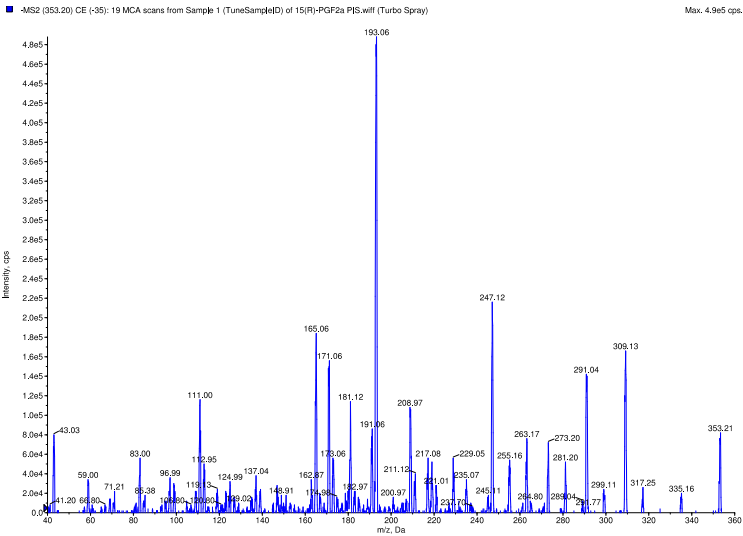


Name	Produktionscan bei -35 V Kollisionsenergie
------	--

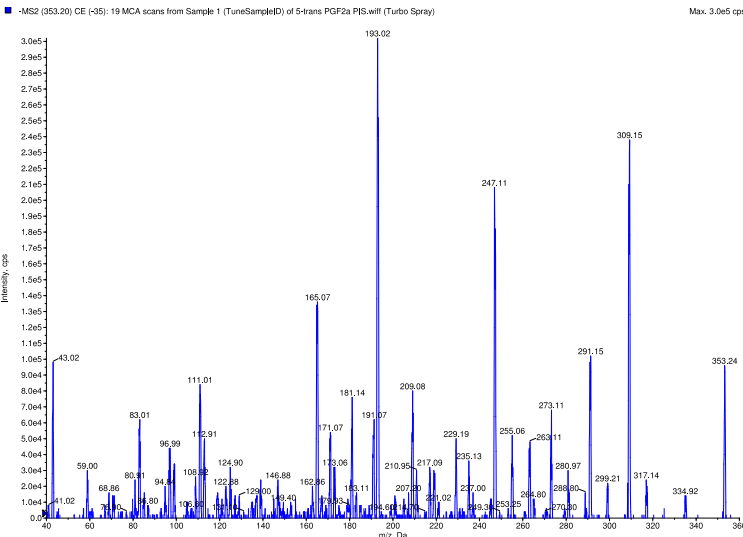
15(R)-IPG F_{2α}



15(R)-PG F_{2α}

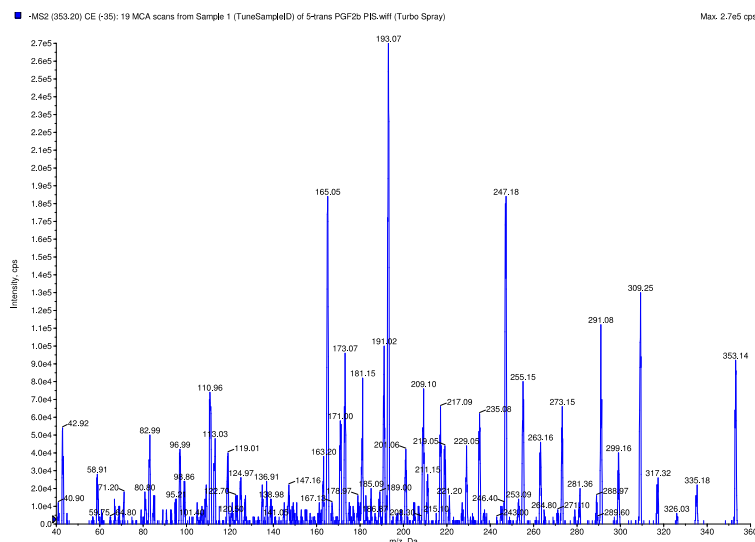


5-trans-PG F_{2α}

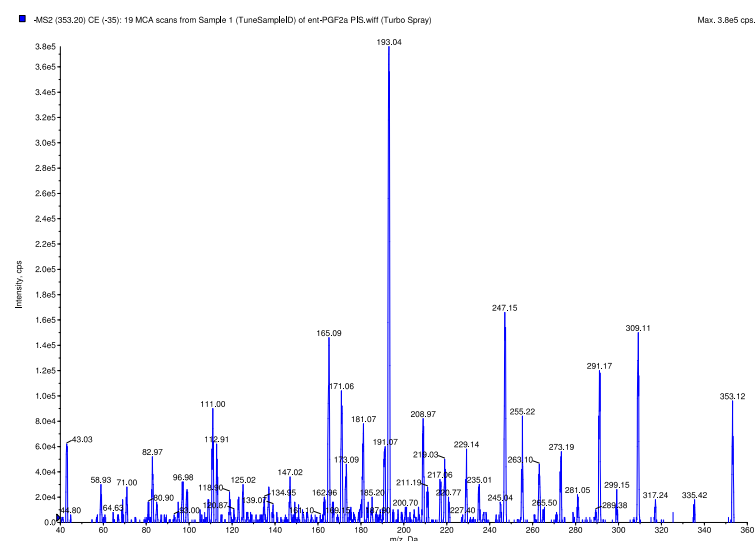


Name	Produktionsenscan bei -35 V Kollisionsenergie
------	---

5-trans-PG F₂ β
(5-trans-9 β -PG F₂ α)



ent-PG F₂ α



Zur weiteren Optimierung wurden die vier bei unterschiedlichen Kollisionsenergien stärksten Fragmentationen des Zielanalyten IPG F₂ α ausgewählt (m/z 309/291/247/193), sowie zusätzlich das bisher in der Literatur nicht beschriebene Fragment mit der Massenzahl m/z 43. Anhand später folgender Versuche in Matrix sollte entschieden werden, welcher Übergang für die zu entwickelnde Analysenmethode am besten geeignet war. Für den vierfach deuterierten internen Standard wurden die analogen Fragmente (m/z 313/295/251/197) und erneut zusätzlich m/z 43 gewählt. Zur weiteren Optimierung wurden die in Tabelle A.2 auf Seite 162 beschriebenen massenspektrometrischen Parameter der Methode 1 festgelegt.

Die verfügbaren isobaren Standardsubstanzen zeigten qualitativ keine relevanten Unterschiede im Fragmentierungsverhalten (s. Tab. 6.1 auf Seite 55). Quantitativ waren geringe Abweichungen der relativen Intensitäten erkennbar, welche aber analytisch für die vorliegende Aufgabe nicht genutzt

werden konnten. Auffällig war eine starke Fragmentierung der Analyten mit einer daraus resultierenden geringeren quantitativen Sensitivität als bei einer Konzentrierung auf wenige Fragmente. In der verfügbaren Literatur besteht Uneinigkeit über das Fragmentierungsschema, insbesondere bezüglich der Struktur des für das 15-Regiomere des Zielanalyten IPG F_{2α} charakteristischen Fragments m/z 193 (s. Abb. 6.1). Sind Strukturvorschläge für das Fragment mit der Massenzahl m/z 193 in älterer Literatur identisch, so gibt es in jüngeren Quellen auch Abweichungen davon [61, 65, 124, 139, 147, 172, 188–190].

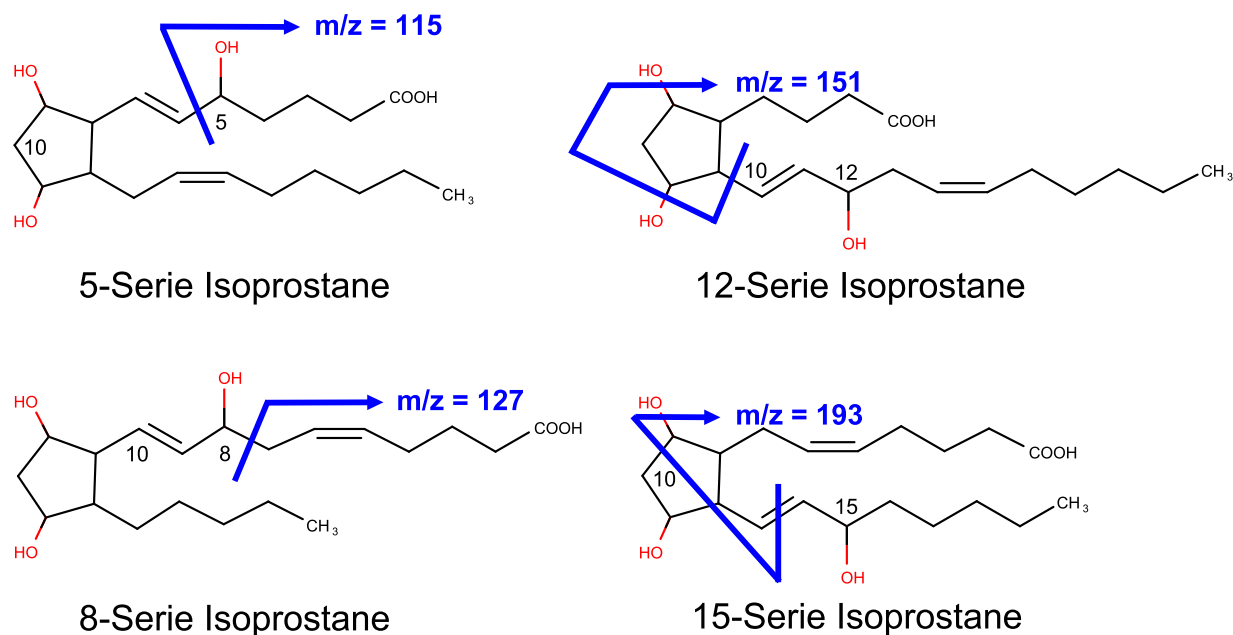


Abb. 6.1.: Darstellung der charakteristischen Hauptfragmente der vier möglichen Isoprostan-Regiomere (Abb. in Anlehnung an [191]); aufgrund der unterschiedlichen Strukturen kann das für den Zielanalyten IPG F_{2α} charakteristische Fragment der 15-Klasse mit der Massenzahl m/z 193 massenspektrometrisch selektiv von den anderen Regiomerern erfasst werden.

Das im Rahmen dieser Arbeit gefundene Fragment m/z 43 wurde in der verfügbaren Literatur bisher nicht beschrieben. Da dieses sowohl aus dem Zielanalyten IPG F_{2α} wie auch dem internen Standard IPG F_{2α}-D4 gebildet wurde, muss es ein unspezifisches Fragment sein, in dem kein deuteriertes Strukturmerkmal mehr vorhanden ist. Möglicherweise handelt es sich dabei um ein Ion aus einer Decarboxylierung der Carboxylgruppe des Isoprostanmoleküls.

6.1.2. Fließmittel-Modifikatoren

Es wurde geprüft, welchen Einfluss unterschiedliche alkalische Modifikatoren unter fixierten chromatographischen Bedingungen auf die Signalstärke von IPG F_{2α} hatten. Als organische Fließmittel-Komponente wurde für diese Versuche Methanol benutzt. Zum Vergleich wurde ein saurer Zusatz von 0,1 % (v/v) Ameisensäure verwendet, wie er in der LC-MS weit verbreitet und in vielen Laboren üblich ist.

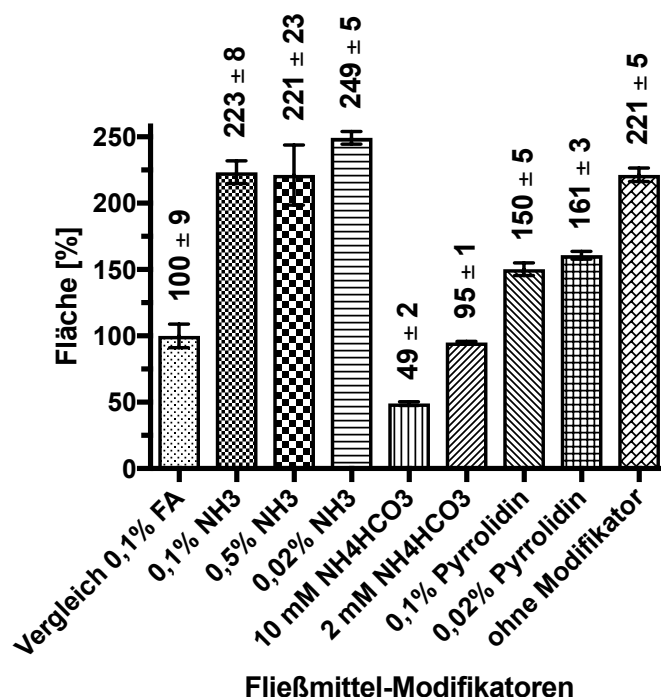


Abb. 6.2.: Darstellung des Einflusses verschiedener Fließmittel-Modifikatoren auf die Signalflächen (normiert) von IPG $F_{2\alpha}$; unter alkalischen Bedingungen zeigt die deprotonierte Carbonsäure IPG $F_{2\alpha}$ ein stärkeres Signal als bei sauren Fließmitteln, bei denen die Carbonsäure ungeladen vorliegt. Salzzusätze verringern das Detektorsignal aufgrund von Suppressions-effekten, auch wenn es sich dabei um basische Salze handelt.

Das stärkste Signal der geprüften Zusätze ergab sich bei der Verwendung von 0,02 % (v/v) Ammoniaklösung (s. Abb. 6.2). Unter sauren Bedingungen wurde im Vergleich dazu ein etwa nur halb so starkes Signal erzeugt, was auf die dabei nicht-ionisierte Carbonsäurefunktion des Zielanalyten zurückzuführen ist. Eine Erhöhung des Ammoniak-Anteils ergab keine weitere Steigerung der Signalfläche von IPG $F_{2\alpha}$. Aufgrund des pKs-Wertes der Zielsubstanz IPG $F_{2\alpha}$ von etwa 4,4 (s. hierzu unter 2.5.5 auf Seite 12) konnte mit geringen Modifikator-Mengen gearbeitet werden. Die Verwendung von flüchtigen basischen Puffersalzen oder einer noch stärkeren flüchtigen Base wie Pyrrolidin führte zu einer deutlichen Signalsuppression im Vergleich mit ammoniakalischen Zusätzen. Fließmittel ohne Modifikatoren zeigten zwar eine starke Intensität, ergeben aber aufgrund der fehlenden Pufferwirkung bei geladenen Analyten üblicherweise keine gut reproduzierbaren chromatographischen Signale oder oft schlechte Peakformen [187]. Für die weiteren Optimierungen wurde zunächst 0,02 % (v/v) Ammoniaklösung als Fließmittel A und Methanol + 0,02 % (v/v) Ammoniaklösung als Fließmittel B verwendet.

6.1.3. Einfluss des Aufnahmelösungsmittels nach Evaporation

Evaporation ist ein üblicher und wichtiger Schritt nach einer Extraktion (z. B. Festphasenextraktion) zwecks Aufkonzentrierung und um das Injektionslösungsmittel den chromatographischen Bedingungen anzupassen (Lösungsmittelaustausch). Das zur Aufnahme des Abdampfrückstandes verwendete Lösungsmittel soll den Analyten vollständig lösen. Es ist idealerweise aber nicht zu stark, so dass mitextrahierte Matrixbestandteile möglichst nicht gelöst werden. Zusätzlich ist das Aufnahmelösungsmittel nach einer Evaporation meist gleichzeitig das Injektionslösungsmittel, und muss daher

mit den chromatographischen Startbedingungen kompatibel sein, also im Idealfall gleichstark oder schwächer als die Anfangsbedingungen der Flüssigchromatographie.

Da die Entwicklung einer Extraktion mittels Festphasenextraktion (SPE) angedacht war (s. unter 3.1 auf Seite 25) wurde der Einfluss des Lösungsmittels auf die Aufnahme des Abdampfrückstandes nach einer Evaporation evaluiert. Dazu wurden jeweils 10 µL einer methanolischen Analytlösung (100 ng/mL IPG F_{2α}) einer für dieses Volumen harten Evaporationsbedingung von fünf Minuten ausgesetzt. Der Rückstand wurde in unterschiedlich starken Lösungsmittelmischungen (0-50 % (v/v) Methanol in Wasser) aufgenommen. Zusätzlich wurden direkte Injektionen von entsprechenden Lösungen (100 ng/mL IPG F_{2α} in 10-50 % (v/v) Methanol in Wasser) ohne Evaporation durchgeführt. Mit Hilfe dieser Direktinjektionen sollten mögliche Adsorptionseffekte an die Gefäßwände unter den gewählten Lösungsmittelbedingungen evaluiert werden. Da die Lösungen zur direkten Injektion aus einer methanolischen Stammlösung hergestellt wurden, war es nicht möglich eine rein wässrige Vergleichslösung herzustellen. Die als Referenz verwendete IPG F_{2α}-Lösung zur direkten Injektion hatte einen restlichen Anteil von 1 % Methanol. Es wurde ein prozentualer Vergleich der resultierenden Signalfächen bezogen auf die direkte Injektion von IPG F_{2α} in 1 % (v/v) Methanol in Wasser ohne Abdampfen als Referenz durchgeführt (s. Abb. 6.3).

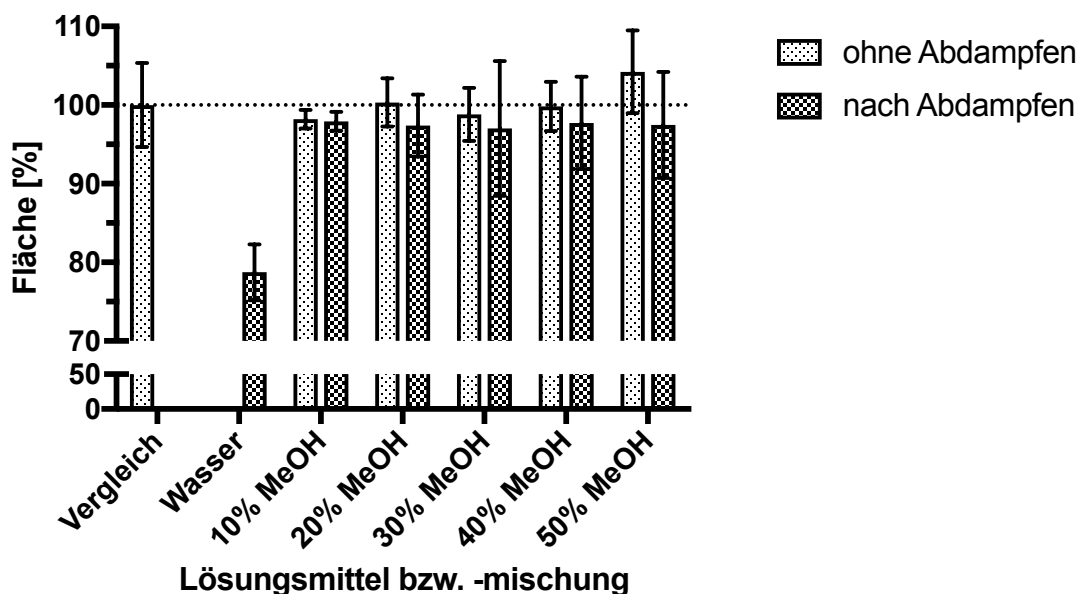


Abb. 6.3.: Darstellung des Einflusses unterschiedlicher Lösungsmittelmischungen zur Aufnahme des Abdampfrückstandes auf die IPG F_{2α}-Signalfächen (normiert); die prozentualen Angaben der Lösungsmittelmischungen beziehen sich auf (v/v). Abgesehen von Wasser zeigen alle getesteten Lösungsmittelmischungen eine nahezu vollständige Aufnahme des Rückstandes. Bei Wasser liegen möglicherweise Adsorptionseffekte des eher unpolaren Analyten an die Gefäßwände vor, welche sich durch bereits geringe Mengen eines organischen Lösungsmittels wie Methanol unterbinden lassen.

Während bei einer Aufnahme des Abdampfrückstands in reinem Wasser deutliche IPG F_{2α}-Verluste nach der Evaporation zu verzeichnen waren, ergaben sich bei den übrigen Lösungsmittelmischungen nur geringe Unterschiede zum Vergleichswert in 1 % Methanol (v/v) ohne Evaporation. Wasser ist als Lösungsmittel des Abdampfrückstandes wenig geeignet, möglicherweise bewirkt es aufgrund seiner Polarität Adsorptionseffekte des eher unpolaren Analyten IPG F_{2α} an die Gefäßwände. Bereits geringste Mengen Methanol können diese Adsorption unterbinden, wie an der direkten Injektion der

Vergleichslösung in 1 % Methanol (v/v) sichtbar wird. Zur Aufnahme und Injektion bietet sich ein Lösungsmittelgemisch mit möglichst wenig organischem Anteil an (z. B. 10 % (v/v) Methanol), sofern dieses mit den noch zu optimierenden chromatographischen Bedingungen kompatibel ist. Gleichzeitig war die Mischung mit 10 % (v/v) Methanol das schwächste der auch mit einer Evaporation getesteten Lösungsmittelgemische, es sollte daher weniger von stärker lipophilen Substanzen coextrahieren als ein stärkeres Lösungsmittelgemisch mit einem höheren organischen Anteil.

6.1.4. Ermittlung grundlegender DMS-Parameter - Proof of Principle

Isoprostane zeigen gegenüber Prostaglandinen nur geringe Unterschiede in der räumlichen Ausrichtung (s. Tab. 4.8 auf Seite 32), welche möglicherweise durch die Verwendung des Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Moduls SelexION zu einer erhöhten Selektivität führen können. Zum Testen einer möglichen Veränderung der Sensitivität durch die SelexION-Temperatur wurde der Parameter DMS-Temperatur (DT) mit den drei möglichen Einstellungen low (150 °C), medium (225 °C), und high (300 °C) geprüft (s. Abb. 6.4).

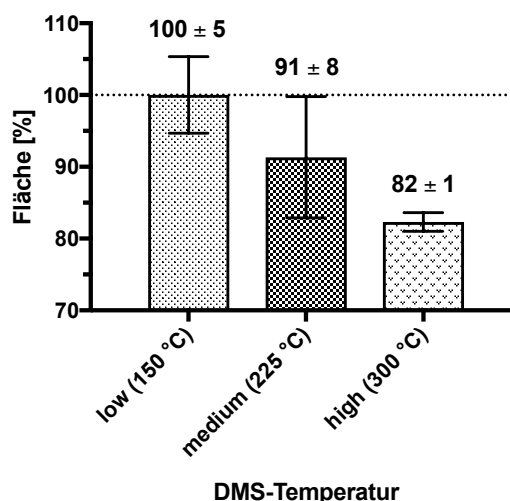


Abb. 6.4.: Darstellung des Einflusses der Temperatur der DMS-Zelle auf die Signalfäche (normiert) von IPG F_{2α}.

Die Signalstärke sank mit steigender Temperatur. Bezogen auf den Wert bei niedriger DMS-Temperatur verminderte sich der Mittelwert der Signalfäche auf 91 % bei mittlerer bzw. 82 % bei hoher Temperatur. Es wurde deshalb mit niedriger Temperatur des DMS-Moduls weitergearbeitet. Für diesen Versuchsteil lag noch keine Trennung der Isomere vor, es wurde das summarische Signal von IPG F_{2α} und PG F_{2α} zur Auswertung herangezogen.

Mit der Modulation der Trennungsspannung (Separation Voltage, SV) wurde versucht, bei gegebener DMS-Temperatur (low, 150 °C) eine Trennung der Isomere IPG F_{2α} und PG F_{2α} im DMS-Modul SelexION zu erreichen. Die Optimierung wurde schrittweise durchgeführt, dazu wurde die Kompensationsspannung (COV) bei unterschiedlichen Trennungsspannungen (SV) abgefahren (s. Tab. 6.2 auf der nächsten Seite). Dadurch ergibt sich ein Ionogramm (s. Abb. 6.6 auf Seite 65 als Beispiel), dessen Maximum die COV-Einstellung mit der stärksten Transmission des Zielanalyten durch die DMS-Zelle angibt. Ziel dieser Optimierung kann beispielsweise ein möglichst starkes Signal sein, oder wie in diesem Fall eine möglichst gute Selektivität zwischen den zwei Beispielisomeren IPG F_{2α} und PG F_{2α}, welche sich nur in der Ausrichtung der Ketten zum Prostanring (in Position 8) unterscheiden (s. Tab. 4.8 auf Seite 32).

Im Bereich der Trennungsspannung (SV) von 0-3000 V verschob sich nur die Lage des Wertes der optimalen Kompensationsspannung (s. Tab. 6.2 bzw. Abb. 6.5). Ab einer SV von 3500 V spaltete sich das Signal in zwei Peaks mit unterschiedlichen COV-Optima für die beiden Epimere IPG F_{2α} und PG F_{2α} auf. Mit weiter ansteigender Trennungsspannung wurde der Unterschied in den COV-Maxima und damit die Trennung der beiden Substanzen durch das SeleXION bis zur maximalen SV-Einstellung von 4000 V stetig größer (s. Tab. 6.2 bzw. Abb. 6.6 auf der nächsten Seite).

Tab. 6.2.: Ergebnisse der Ermittlung der Kompensationsspannung (COV) der beiden Epimere IPG F_{2α} und PG F_{2α} in Abhängigkeit von der Trennungsspannung (SV)

Trennungsspannung (SV) [V]	Kompensationsspannung (COV) [V]		
0	-0,2		
500	0		
1000	0,1		
1500	0,4		
2000	1,1		
2500	2,4		
3000	4,2		
	Peak 1	Peak 2	Δ [V]
3500	5,7	7,5	1,8
3600	6,0	8,4	2,4
3700	6,4	9,3	2,9
3800	7,1	10,0	2,9
3900	7,7	10,9	3,2
4000	8,3	11,9	3,6

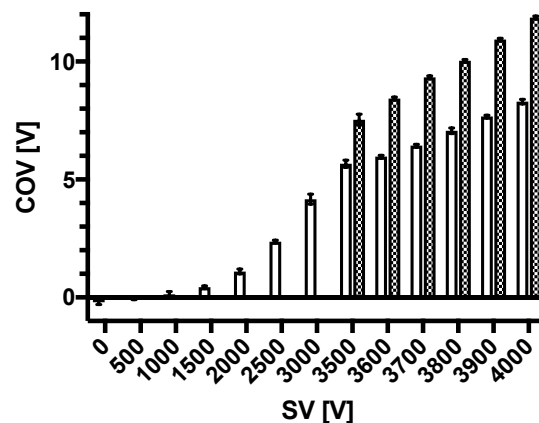


Abb. 6.5.: Darstellung der optimalen Kompensationsspannungen (COV) in Abhängigkeit von der Trennungsspannung (SV) für die beiden Epimere IPG F_{2α} und PG F_{2α}; nach einer kompletten Überlagerung werden erst ab einer SV von 3500 V zwei Signale gebildet (Peak 1 hell, Peak 2 dunkel). Die Differenz der COV-Werte zwischen den beiden Signalen steigt mit zunehmender SV an. Je größer der Unterschied in der optimalen COV-Einstellung ist, umso leichter lassen sich die Substanzen durch das DMS-Modul getrennt voneinander erfassen. Eine Zuordnung dieser Signale zu einem der beiden Epimere war zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich, da der charakteristische COV-Wert der Einzelsubstanzen unter den gegebenen Bedingungen nicht bekannt war.

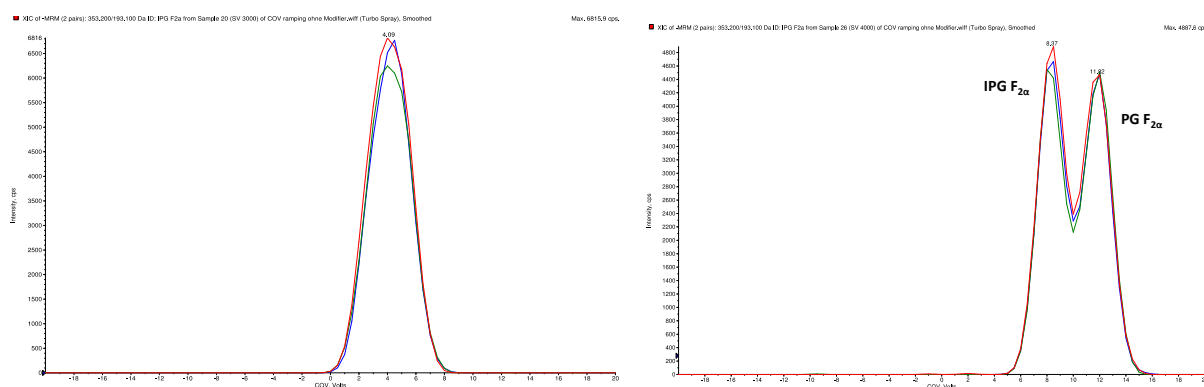


Abb. 6.6.: Ionogramme einer Mischung der beiden Epimere IPG F_{2α} und PG F_{2α} bei den Trennspannungen (SV) 3000 V (links) bzw. 4000 V (rechts); dargestellt ist jeweils eine Überlagerung von drei Messungen. Bei einer Trennspannung von 4000 V ist eine deutliche Trennung der Epimere erkennbar, bei einer Einstellung von 3000 V liegt eine komplette Überlagerung vor. Die Zuordnung der Isomere zum jeweiligen Signal erfolgte nachträglich als die charakteristischen COV-Werte der einzelnen Referenzsubstanzen bekannt waren.

Anschließend wurden die optimalen Einstellungen der Kompensationsspannung jeder einzelnen Referenzsubstanz bei den so ermittelten Parametern (DMS-Temperatur low (150 °C) und SV 4000 V) bestimmt (s. Tab. 6.3).

Tab. 6.3.: Ergebnisse der Ermittlung der Kompensationsspannung (COV) aller Referenzsubstanzen bei einer Trennspannung (SV) von 4000 V

Substanz	Synonym	COV [V]
8-Isoprostaglandin F _{2α} -D4	IPG F _{2α} -D4	8,4
8-Isoprostaglandin F _{2α}	IPG F _{2α}	8,4
8-Isoprostaglandin F _{2β}	IPG F _{2β}	10,0
Prostaglandin F _{2α}	PG F _{2α}	12,0
Prostaglandin F _{2β}	PG F _{2β}	10,9
11β-Prostaglandin F _{2α}	11β-PG F _{2α}	10,3
8-iso-15(R)-Prostaglandin F _{2α}	15(R)-IPG F _{2α}	8,1
15(R)-Prostaglandin F _{2α}	15(R)-PG F _{2α}	12,2
5-trans-Prostaglandin F _{2α}	5-trans-PG F _{2α}	13,0
5-trans-Prostaglandin F _{2β}	5-trans-PG F _{2β}	12,1
ent-Prostaglandin F _{2α}	ent-PG F _{2α}	11,9

Die optimalen Werte der Kompensationsspannung (COV) der einzelnen Referenzsubstanzen zeigten mit Ausnahme des deuterierten internen Standards Unterschiede im Vergleich zum Zielanalyten IPG F_{2α}. Es ergaben sich Differenzen von 0,3 V bis hin zu maximal 4,6 V. Dieses zeigte, dass das SelexION-Modul tatsächlich zur Erhöhung der Selektivität der Isoprostananalytik geeignet war. Die beiden Isomere IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} ergaben sehr ähnliche Kompensationsspannungen, diese Substanzen werden daher als „DMS-kritisch“ angesehen. Eine Trennung über das SelexION-Modul war aufgrund der geringen Unterschiede für diese beiden Isomere zweifelhaft, hier war eine chromatographische Trennung erforderlich.

6.2. Optimierung chromatographischer Parameter

Nach den Ergebnissen der grundlegenden Tests des Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Moduls SelexION (s. unter 6.1.4 auf Seite 63) war die chromatographische Trennung aller kommerziell verfügbarer Isomere für eine selektive Bestimmung von IPG F_{2α} nicht nötig. Die meisten Stereoisomere konnten aufgrund der Unterschiede in der räumlichen Ausrichtung der Moleküle mit Hilfe des SelexION-Moduls selektiv erfasst werden. Lediglich 15(R)-IPG F_{2α} musste vom Zielanalyten IPG F_{2α} chromatographisch abgetrennt werden. Für eine möglichst sensitive Methode wurden zunächst alkalische Fließmittel mit einem Zusatz von 0,02 % Ammoniaklösung verwendet, obwohl diese in der verfügbaren Literatur über Isoprostane eher selten beschrieben werden, hier dominieren saure Bedingungen in der Chromatographie. Aufgrund der angedachten Festphasenextraktion (SPE) mit dem dafür nötigen (Zeit-)Aufwand war zum Ausgleich eine schnelle und für einen hohen Durchsatz geeignete chromatographische Methode geplant. Daher wurde zur Chromatographie eine kurze Umkehrphasen-Säule mit hoher pH-Toleranz verwendet. Unter isokratischen Bedingungen mit einem Fließmittel-Anteil von 50 % B war keine Trennung erkennbar, die beiden Isomere 15(R)-IPG F_{2α} und IPG F_{2α} überlagerten sich vollständig. Bei 40 % Fließmittel B war eine deutliche Antrennung erkennbar, ab 35 % B lag eine Basislinientrennung der beiden Analyte vor. Durch die Variation von Temperatur und Flussrate veränderten sich Lage und Trennung der Substanzen. Eine höhere Temperatur oder Flussrate beschleunigte die Elution und verringerte die Trennung, ermöglichte damit aber auch eine kürzere Methode durch schnelleres Spülen und Rekonditionieren der Säule. Bei höherem Fluss waren die Peaks schmäler und höher als bei geringerer Flussrate. Eine deutliche Trennung der Zielanalyten war bei 30 % Fließmittel B erreicht, um die Methode kurz zu halten wurde ein Fluss von 400 µL/min bei 50 °C gewählt (s. Abb. 6.7).

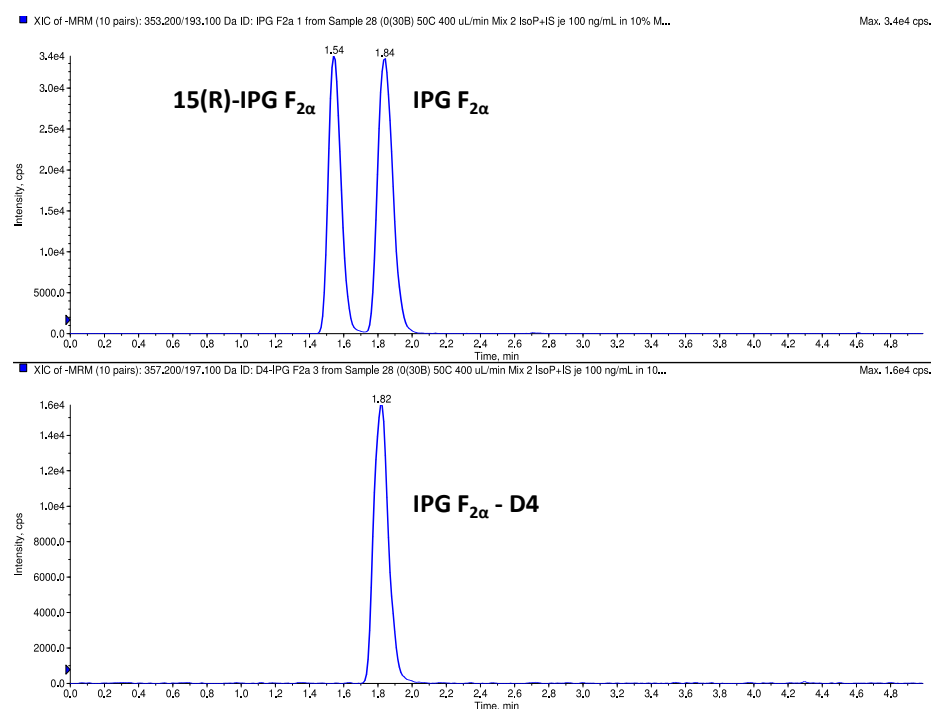


Abb. 6.7.: Darstellung der Trennung der Isomere 15(R)-IPG F_{2α} und IPG F_{2α} bei 30 % Fließmittel B, 50 °C und 400 µL/min (oben: Zielanalyte, unten: interner Standard).

Eine Basislinientrennung der beiden DMS-kritischen Isomere 15(R)-IPG F_{2α} und IPG F_{2α} gelang chromatographisch bereits auf einer kurzen Trennsäule innerhalb von zwei Minuten unter isokra-

tischen Bedingungen (s. Abb. 6.7 auf der vorherigen Seite). Dieses bestätigte, dass es sich bei der differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS) um eine zur Chromatographie orthogonale Technik handelt. Aufgrund anderer Trennprinzipien hatte diese das Potential zur Erzeugung einer deutlich veränderten Selektivität.

6.3. Optimierung der Ionenquellenparameter

Die Optimierung der Ionenquellen-Einstellungen sollte einerseits ein möglichst starkes Signal erzeugen, andererseits aber auch das Messgerät vor Kontaminationen schützen. Es musste daher eine Balance zwischen Signalintensität und Robustheit berücksichtigt werden. Zur Optimierung der Quellenparameter per T-Infusion wurden Fließmittel-Bedingungen gewählt, die denen der Trennung bzw. der Retention des Zielanalyten IPG F_{2α} bei den angedachten LC-Parametern entsprachen, also isokratisch bei 30 % Fließmittel B (s. unter A.2 auf Seite 162). Zur Auswertung wurde die Signalintensität der Infusion über einen Zeitraum von 0,5 Minuten aufgezeichnet und gemittelt, um Schwankungen im Signal auszugleichen. Die Ionenquellenparameter wurden einzeln nacheinander optimiert, dabei jeder Parameter inkrementell verändert (s. Tab. 5.3 auf Seite 37).

Die Signalintensität zeigte in der Optimierung des Curtain Gas (CUR) tendenziell einen zu erwartenden Verlauf, mit steigendem CUR-Wert sank das Signal (s. Abb. 6.8), bei 40 psi ergab sich ein lokales Maximum. Möglicherweise lag hier ein optimales Zusammenspiel verschiedener Quellenparameter vor, welche summarisch ein stärkeres Signal erzeugen.

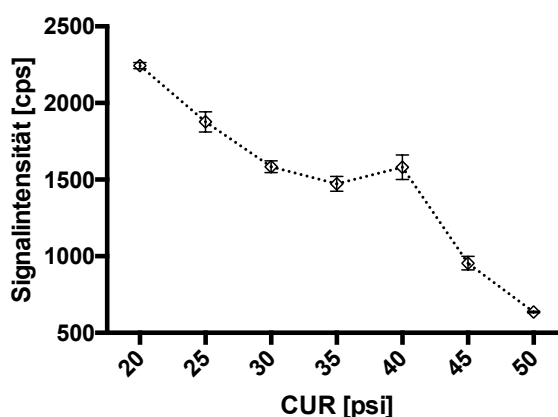


Abb. 6.8.: Darstellung der Signalintensität von IPG F_{2α} in Abhängigkeit von der Einstellung des Curtain Gas (CUR).

Abhängig von der geforderten Sensitivität der Methode sollte der CUR-Wert als Schutz des Massenspektrometers vor Verschmutzung möglichst hoch gewählt werden, andererseits war dieser Parameter eine effektive und einfache Möglichkeit um die Sensitivität des Verfahrens zu steigern. Die Einstellung des Curtain Gas sollte zum Schutz des Systems gegen Verunreinigung möglichst nicht unter 20 psi liegen. Da eine Aufarbeitung bis hierhin noch nicht vorlag, war nicht bekannt wie sensitiv die Methode sein würde. Daher wurde zunächst eine CUR-Einstellung von 40 psi gewählt um das Massenspektrometer vor Verunreinigung möglichst gut zu schützen. Eine spätere Senkung des CUR-Wertes war möglich um die Sensitivität der Methode zu erhöhen. Eine Veränderung des CUR-Wertes wirkt sich üblicherweise nicht auf andere Quellenparameter aus, somit ist dieses ein einfacher und effektiver Weg zur Erhöhung der Sensitivität des Verfahrens.

Die Signalintensität der Ion Spray Voltage (IS)-Optimierung ergab einen parabolischen Verlauf mit einem Maximum bei -4000 V (s. Abb. 6.9 auf der nächsten Seite). Unterhalb davon war die Ionisierung

nicht vollständig, bei höheren Spannungen kam es möglicherweise zu In-Source Fragmentierungen und die Signalintensität sank dadurch.

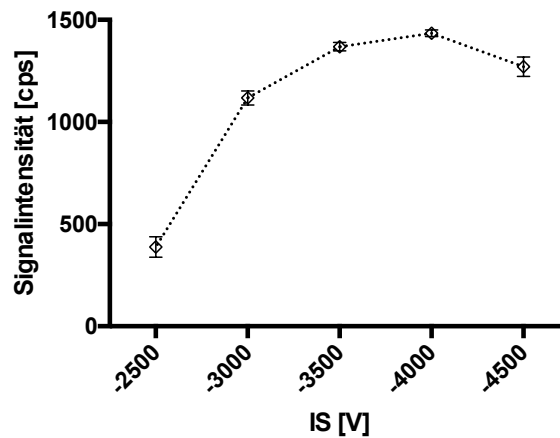


Abb. 6.9.: Darstellung der Signalintensität von IPG F_{2α} in Abhängigkeit von der Einstellung der Ion Spray Voltage (IS).

Mit steigender Nebulizer-Temperatur (TEM) erhöhte sich auch die Signalintensität kontinuierlich (s. Abb. 6.10). Zur Schonung des Materials im Dauerbetrieb und unter Routinebelastungen wurde keine Einstellung von über 700 °C getestet (der Maximalwert des Gerätes liegt bei 750 °C).

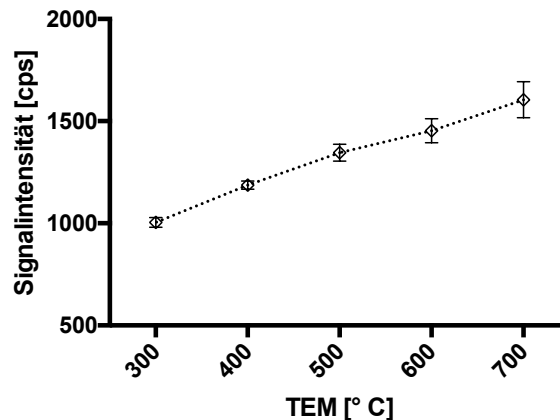


Abb. 6.10.: Darstellung der Signalintensität von IPG F_{2α} in Abhängigkeit von der Einstellung der Nebulizer-Temperatur (TEM).

Die Signalintensität der Nebulizer Gas (GS1)-Optimierung zeigte ein Maximum bei 40 psi. Bei diesen Bedingungen war die Vernebelung des Fließmittel-Stroms am effizientesten und ergab die stärksten Signale (s. Abb. 6.11 auf der nächsten Seite). Bei niedrigeren Werten könnte eine Tröpfchenbildung, bei höheren Werten eine zu starke Vernebelung und damit ein zu breiter Spraystrahl ein Grund der niedrigeren Intensitäten sein. In beiden Fällen ist die Heizleistung nicht optimal, entweder sind die Tröpfchen zu groß für eine effektive Verdampfung oder der Spraystrahl ist nicht genügend auf den Hotspot der Heizstrahler der Quelle fokussiert.

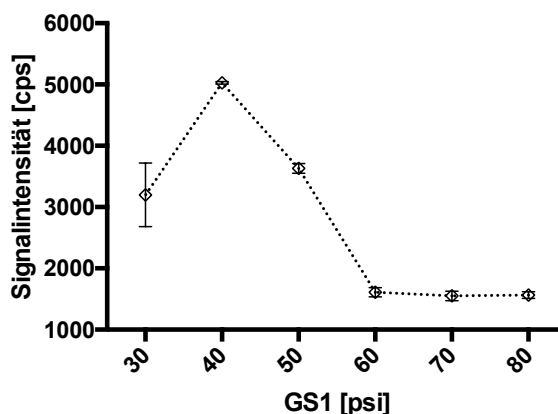


Abb. 6.11.: Darstellung der Signalintensität von IPG $F_{2\alpha}$ in Abhängigkeit von der Einstellung des Nebulizer Gas (GS1).

Die Signalintensität bei der Optimierung des Heater Gas (GS2) zeigte einen leichten Anstieg bis 60 psi mit einem Absinken der Werte darüber (s. Abb. 6.12). Im Maximum der Kurve zeigte die Kombination der Quellenparameter bei der Verdampfung des Fließmittels und der Ionisierung der Analytmoleküle die effektivste Wirkung.

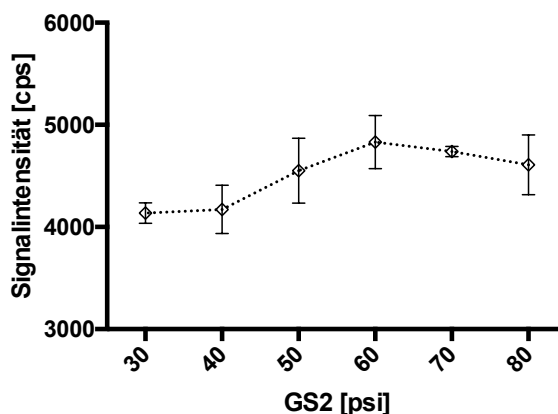


Abb. 6.12.: Darstellung der Signalintensität von IPG $F_{2\alpha}$ in Abhängigkeit von der Einstellung des Heater Gas (GS2).

Schlussfolgernd aus diesen Optimierungsexperimenten wurden für die weiteren Versuche die in Tabelle 6.4 angegebenen Ionenquellenparameter festgelegt.

Tab. 6.4.: optimierte Ionenquellenparameter

Parameter	Einstellung
Curtain Gas (CUR)	40 psi
Ion Spray Voltage (IS)	-4000 V
Temperature (TEM)	700 °C
Nebulizer Gas (GS1)	40 psi
Nebulizer Gas (GS2)	60 psi

Abgeleitet aus den grundlegenden DMS-Parametern (s. unter 6.1.4 auf Seite 63) sowie der Optimierung von Chromatographie (s. unter 6.2 auf Seite 66) und den Ionenquellenparametern (s. Tab. 6.4 auf der vorherigen Seite) ergab sich Methode 2 (s. Tab. A.3 auf Seite 164). Anschließend wurde geprüft, wie sich die optimierten Quellenparameter mit der Injektion einer Lösung des Zielanalyten und chromatographischer Trennung auf die Signalintensität im Vergleich zu den Quelleneinstellungen der generischen Methode 1 (s. Tab. A.2 auf Seite 162) auswirkten (s. Abb. 6.13).

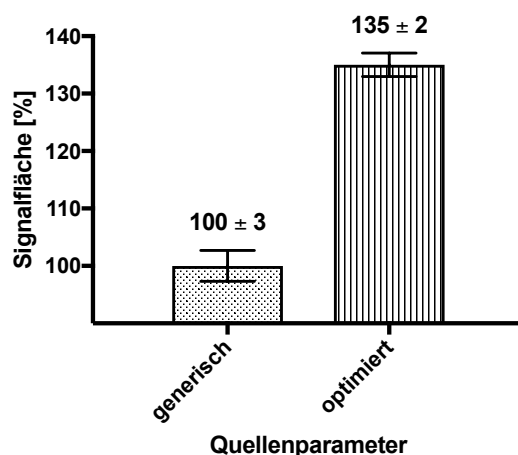


Abb. 6.13.: Darstellung der Signalflächen (normiert) von IPG F_{2α} mit Quellenparametern vor (generisch) und nach der Optimierung; die unter identischen chromatographischen Bedingungen aufgezeichneten Messungen zeigten einen Signalanstieg um +35 % durch die Optimierung.

Im Vergleich zur durchschnittlichen Peakfläche der ursprünglichen Quellenparameter (generisch) ergab sich mit den optimierten Einstellungen eine Steigerung der Signalfläche um +35 %.

6.4. Optimierung der DMS-Parameter

Zur Optimierung der Parameter des Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Moduls waren Mehrfachinjektionen von jeder Referenzsubstanz nötig. Im Rahmen dieser ersten langen Versuchsreihe mit der aktuellen Methode 2 (s. Tab. A.3 auf Seite 164) wurden Instabilitäten festgestellt, der Zielanalyt IPG F_{2α} zeigte eine sinkende Retentionszeit. Möglicherweise war dieses eine Konsequenz der Dauerbelastung des Säulenmaterials mit einem alkalischen Fließmittel. Obwohl eine Trennung der Substanzen weiterhin gegeben war, hätten die Messserien für zukünftige Versuchsreihen und die Realanwendung auf Taucherproben kurz gehalten werden müssen, um stabile und nicht fluktuierende Retentionszeiten einzuhalten. In der verfügbaren Literatur über Isoprostane wird üblicherweise mit Säurezusätzen gearbeitet, obwohl die Signalintensität unter alkalischen Bedingungen stärker ausfällt. Daher wurde die Entscheidung getroffen, eine neue Chromatographie unter sauren Bedingungen zu entwickeln. Ausgehend von den Erfahrungen und substanzabhängigen Parametern der bisherigen Methode wurde geprüft, ob damit eine Robustheit der Retention und die nötige Sensitivität für die Aufgabenstellung erreicht werden konnte. Aus den zu diesem Abschnitt durchgeführten Versuchen konnten dennoch wichtige Erkenntnisse über die Funktion und das Potential des DMS-Moduls SelexION gewonnen werden (s. hierzu auch unter 7.2 auf Seite 136).

6.5. Chromatographie unter sauren Bedingungen

In Anlehnung an die Entwicklung einer alkalischen Chromatographie (s. unter 6.2 auf Seite 66) war zu prüfen, ob unter sauren Bedingungen eine ausreichende chromatographische Trennung der beiden DMS-kritischen Isomere IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} möglich ist. Die Parameter der Ionenquelle und der Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Zelle waren vorwiegend analytspezifisch und hängen ansonsten von der Flussrate ab. Insofern war keine Anpassung nötig, da beide Bedingungen nicht verändert wurden. Bleiben Flussrate und Quellenparameter unverändert, sind die Auswirkung auf Ionenquelle und DMS-Zelle vernachlässigbar, es musste weiterhin eine chromatographische Trennung des kritischen Pärchens IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} erfolgen. Als Carbonsäure sollte sich die Retention von IPG F_{2α} in einem sauren Milieu verstärken und ein höherer Anteil Fließmittel B zur Elution erforderlich sein im Vergleich zu einer Chromatographie mit alkalischen Zusätzen. Unter isokratischen Bedingungen war bei einem Fließmittel-Anteil von 70 % B keine Trennung erkennbar, beide Isomere überlagerten sich vollständig. Ab 60 % Fließmittel B wurde eine Antrennung deutlich erkennbar, ab 50 % B lag eine Basislinientrennung der beiden Analyte vor (s. Abb. 6.14). Unter sauren Bedingungen konnte auf einer kurzen Umkehrphasen (RP)-Säule eine Basislinientrennung der beiden DMS-kritischen Isomere IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} in 2,5 Minuten erreicht werden (s. Abb. 6.14).

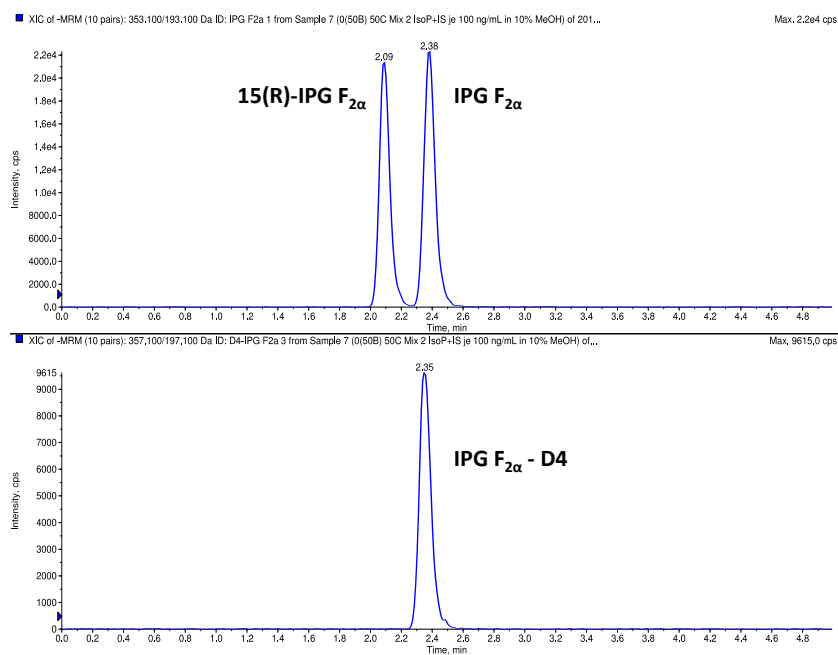


Abb. 6.14.: Darstellung der Trennung der Isomere 15(R)-IPG F_{2α} und IPG F_{2α} bei 50 % FM B, 50 °C und 400 µL/min (oben: Zielanalyte, unten: interner Standard).

6.6. DMS-Optimierung unter sauren Bedingungen

Nachdem eine chromatographische Trennung des für eine Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS) kritischen Isomerenpaares IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} vorlag, war zu prüfen ob die DMS-Einstellungen unter einer veränderten sauren Chromatographie angepasst werden mussten. Das Ziel war eine möglichst starke Transmission des Zielanalyten IPG F_{2α} bei möglichst vollständiger Ausblendung aller übrigen Isomere zu erreichen. Isomere mit ungenügender Selektivität durch das DMS-Modul SelexION mussten chromatographisch abgetrennt werden. Eine DMS-Transmissionsrate von unter 5 % wurde als nahezu vollständige Selektion bewertet. Für die praktische Anwendung im vorliegenden Fall einer Ultraspurenanalytik wurde eine Transmission von < 10 % als ausreichend angesehen, insbesondere da gemäß der verfügbaren Literatur [70, 100] die potentiell im SelexION interferierenden Isomere in Realproben nicht zu erwarten waren. Es wurde ein sog. Mapping, also eine Feineinstellung der SelexION-Parameter, mit Injektion auf die Trennsäule durchgeführt. Um mögliche durch das System verursachte Schwankungen zu minimieren (z. B. durch die unterschiedlichen Injektionen), wurden dabei die betreffenden Parameter (hier Kompensationsspannung COV) in derselben Methode variiert, und derselbe Massenübergang mit unterschiedlichen COV-Einstellungen aus einer Injektion parallel aufgezeichnet.

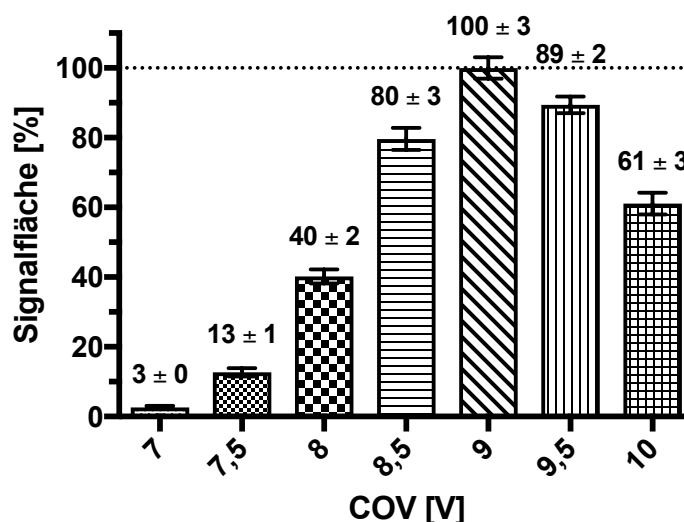


Abb. 6.15.: Darstellung der Signalflächen (normiert) von IPG F_{2α} in Abhängigkeit von der Kompensationsspannung (COV); ausgehend vom Optimum bei 9 V sinkt die Signalfläche von IPG F_{2α}, wenn die Einstellung des COV-Wertes verändert wird.

Der Verlauf des COV-Mappings (s. Abb. 6.15) zeigte ein Maximum der Flächenwerte für IPG F_{2α} bei einer Kompensationsspannung von 9 V. Der höhere Anteil eines organischen Fließmittels zur Elutionszeit des Zielanalyten im Vergleich zu alkalischen Bedingungen scheint die Verhältnisse in der DMS-Zelle wenig zu beeinflussen. Vor allem die Temperatur der Quelle und die Flussrate wirken sich auf die DMS-Zelle aus, beide wurden nicht verändert.

Im folgenden DMS-Mapping wurden die Bedingungen verfeinert. Hierzu wurden alle Referenzsubstanzen einzeln (incl. internem Standard) mit COV-Einstellungen ausgehend von 9 V (dem Optimum für IPG F_{2α}) gemessen und die Kompensationsspannung in 0,25 V-Inkrementen bis 8 V gesenkt. Zum Vergleich wurden entsprechende Injektionen ohne Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS) durchgeführt und dazu das SelexION-Modul ausgeschaltet. Einziger Unterschied beider Varianten war die Zykluszeit (Cycle Time) des Systems, da bei eingeschaltetem DMS-Modul eine zusätzliche

Zeitspanne von 20 Millisekunden zu jedem Massenübergang bei der Messung als Umschalt- und Equilibrierzeit für die DMS-Zelle hinzukommen. Die Unterschiede der Zykluszeit der Methoden und damit die Anzahl an Datenpunkten ist aber für die durchgeführten Versuche in Anbetracht der Peakbreite nicht von Belang, es wurden unter beiden Bedingungen ausreichend Datenpunkte über den Peak erzeugt.

Das Optimum der Kompensationsspannung (COV) der meisten anderen Isomere lag den bisherigen Ergebnissen nach höher als 9 V (s. Tab. 6.3 auf Seite 65). Mit diesen Versuchen konnte nun festgestellt werden, wie weit nötigenfalls die COV-Einstellung gesenkt werden müsste, um eine möglichst geringe Transmission der anderen Isomere zu erreichen (s. hierzu Abb. 7.4 auf Seite 139).

Im Rahmen des DMS-Mappings waren Mehrfachinjektionen von jeder Referenzsubstanz nötig. Somit wurden hier die ersten langen Serien unter sauren Bedingungen gemessen. Aus den Daten des DMS-Mappings (hier aus den Injektionen ohne DMS) wurde die Retention der einzelnen Substanzen entnommen (s. Tab. 6.5). Daraus war ersichtlich, dass unter den verwendeten Bedingungen eine ausreichende Trennung des DMS-kritischen Pärchens IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} gelang. Dagegen war es aufgrund der sehr ähnlichen Retentionszeiten der Isomere IPG F_{2β} und PG F_{2β} zu IPG F_{2α} unbedingt nötig, eine Selektivität zum Zielanalyten über das SelexION zu erreichen. Eine Retentionszeitverschiebung, wie unter alkalischen Bedingungen beschrieben (s. unter 6.4 auf Seite 70), konnte nicht beobachtet werden. Die Retention war unter sauren Bedingungen stabil.

Tab. 6.5.: Retentionsdaten bei Verwendung eines sauren Fließmittels

Analyt	Synonym	Retention [min]	relative Retention zu IPG F _{2α} -D4
8-iso-15(R)-Prostaglandin F _{2α}	15(R)-IPG F _{2α}	2,07	0,89
Prostaglandin F _{2β}	PG F _{2β}	2,34	1,01
8-Isoprostaglandin F _{2α}	IPG F _{2α}	2,36	1,01
8-Isoprostaglandin F _{2β}	IPG F _{2β}	2,43	1,04
11β-Prostaglandin F _{2α}	11β-PG F _{2α}	2,60	1,12
5-trans-Prostaglandin F _{2β}	5-trans-PG F _{2β}	2,60	1,12
15(R)-Prostaglandin F _{2α}	15(R)-PG F _{2α}	3,10	1,33
5-trans-Prostaglandin F _{2α}	5-trans-PG F _{2α}	3,30	1,41
ent-Prostaglandin F _{2α}	ent-PG F _{2α}	3,63	1,56
Prostaglandin F _{2α}	PG F _{2α}	3,63	1,56

In der folgenden Abbildung 6.16 auf der nächsten Seite wurden die Analyte dargestellt, welche durch eine potentielle Überschneidung in den optimalen Werten ihrer Kompensationsspannung mit dem Zielanalyt IPG F_{2α} eine chromatographische Trennung erforderlich machen (vergleiche hierzu Tab. 6.3 auf Seite 65) und daher als potentielle DMS-Interferenzen betrachtet wurden. Die angegebene prozentuale Transmission bezieht sich auf die Werte der jeweiligen Substanz bei ausgeschalteter DMS-Zelle als 100 %-Vergleichswert. Bei Verwendung der Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS) stiegen die Signalfächen an, dieses lag an einem Fokussierungseffekt durch das SelexION.

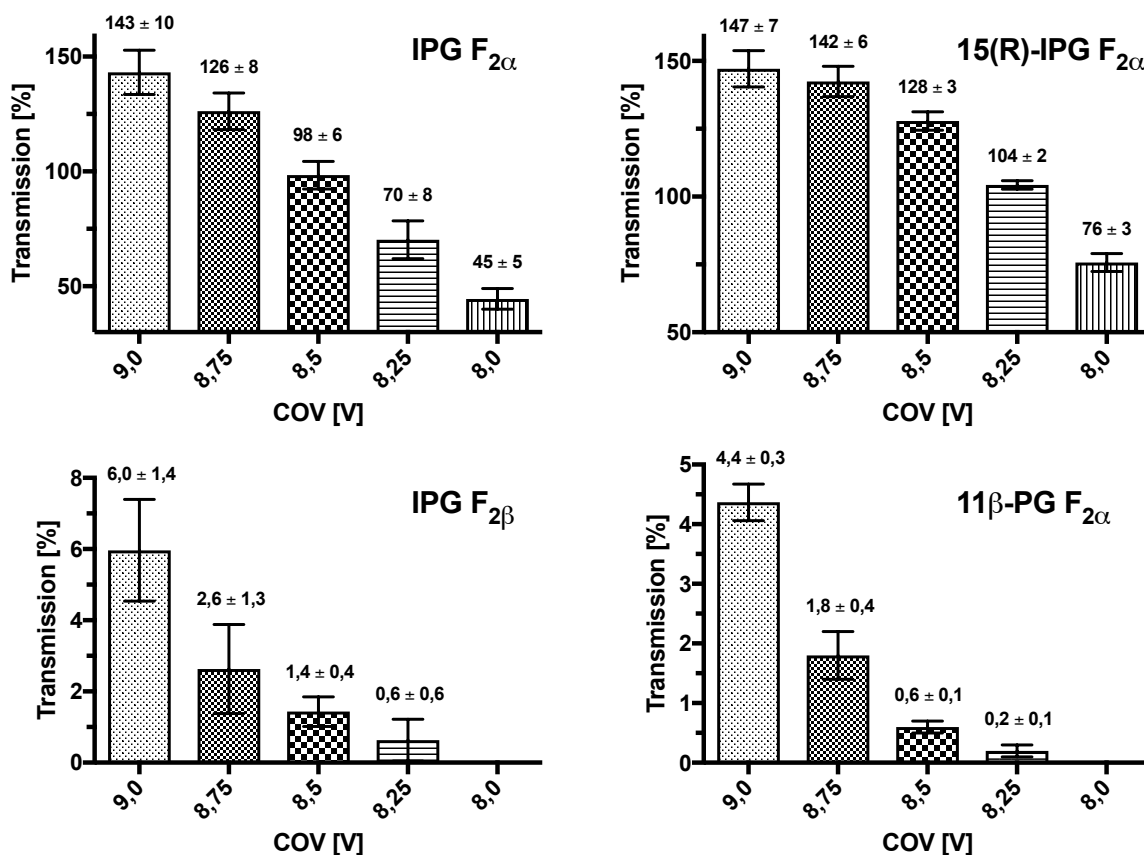


Abb. 6.16.: Darstellung der relativen Transmission der potentiell interferierenden Isomere durch die DMS-Zelle in Abhängigkeit von der Kompensationsspannung (DMS-Mapping); die relative Transmission durch das SeleXION bezieht sich auf den Wert dieser Substanz bei ausgeschaltetem DMS-Modul. Ausgehend vom Optimum der Kompensationsspannung von IPG F_{2α} bei 9 V sinkt die Signalfäche aller Isomere, wenn der COV-Wert gesenkt wird. Bereits bei der Ausgangseinstellung von 9 V werden die Isomere IPG F_{2β} und 11β-PG F_{2α} nahezu vollständig durch das SeleXION-Modul separiert.

Wurde die Kompensationsspannung (COV) des Zielanalyten IPG F_{2α} von dessen Optimum (9,0 V) ausgehend gesenkt, dann verringerte sich die Transmission der Ionen durch die DMS-Zelle. Das COV-Optimum von 15(R)-IPG F_{2α} lag etwas niedriger als bei IPG F_{2α} (s. Tab. 6.3 auf Seite 65). Die Transmission von 15(R)-IPG F_{2α} blieb bei sinkenden COV-Einstellungen daher zunächst relativ stabil und verringerte sich erst bei deutlicher Abweichung vom Optimalwert des Zielanalyten IPG F_{2α}. Eine chromatographische Trennung war hier erforderlich, die Differenz der COV-Werte war nicht ausreichend, um mit Hilfe eines DMS-Moduls die beiden Isomere IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} unter den verwendeten Bedingungen selektiv voneinander zu erfassen. Das Isomer IPG F_{2β} zeigte im COV-Optimum des Zielanalyten (9,0 V) bereits eine nur geringe DMS-Transmission von 6 %, welche durch Veränderung der COV-Einstellung bis zu 8,0 V völlig unterdrückt werden konnte. Auch 11β-PG F_{2α} ergab mit 4 % eine nur sehr geringe Transmissionsrate im COV-Optimum (9,0 V) von IPG F_{2α}, welche durch Senken des COV-Wertes weiter reduziert werden konnte bis hin zu einer völligen Ausblendung.

Die Ergebnisse des DMS-Mappings sind in Tabelle 6.6 auf der nächsten Seite zusammengefasst. Alle in Tabelle 6.6 auf der nächsten Seite nicht genannten Isomere wurden durch das SeleXION vollständig selektiert. Unter den gewählten Einstellungen ergaben die Messungen dieser Substanzen

keine Signale.

Tab. 6.6.: Ergebnisse der Ermittlung der Transmission durch das DMS-Modul

COV [V]	Transmission [%]							
	IPG F _{2α}		15(R)-IPG F _{2α}		IPG F _{2β}		11β-PG F _{2α}	
	relativ*	Δ**	relativ*	Δ**	relativ*	Δ**	relativ*	Δ**
9,0	143,1	0	147,1	0	6,0	0	4,4	0
8,75	126,2	-11,8	142,4	-3,2	2,6	-58,1	1,8	-58,7
8,5	98,4	-31,2	127,9	-13,0	1,4	-76,4	0,6	-86,2
8,25	70,2	-50,9	104,3	-29,0	0,6	-90,0	0,2	-94,9
8,0	44,5	-68,9	75,7	-48,4	0	-100,0	0	-100,0

* Transmission bezogen auf die Signale der jeweiligen Substanz bei ausgeschalteter DMS-Zelle

** prozentual bezogen jeweils auf das Signal bei COV 9,0 V als 100%-Wert

Bis auf die Ausnahme von 15(R)-IPG F_{2α} wurde bei allen verfügbaren Isomeren inklusive IPG F_{2β} und 11β-PG F_{2α} eine Selektivität durch das SelexION im COV-Optimum von 9 V des Zielanalyten IPG F_{2α} erreicht. Es gelang nicht, die Isomere 15(R)-IPG F_{2α} und IPG F_{2α} durch die Verwendung eines DMS-Moduls selektiv zu erfassen. 15(R)-IPG F_{2α} war jedoch chromatographisch vom Zielanalyten IPG F_{2α} deutlich abgetrennt.

6.6.1. Zusammenfassung: Optimierung der LC-DMS-MS/MS-Parameter

Aufgrund der möglichen Verschiebung der Retentionszeiten bei der Verwendung von alkalischen Fließmitteln wurden zwar weniger sensitive, aber dafür stabile saure Bedingungen verwendet. Eine Kombination der zueinander orthogonalen Wirkungen aus differentieller Mobilitätsspektrometrie (DMS) und Chromatographie konnte die Selektivität des Verfahrens erhöhen. Mit Ausnahme des Isomers 15(R)-IPG F_{2α} konnte der Zielanalyt IPG F_{2α} durch das DMS-Modul selektiv von allen anderen Analyten erfasst werden. Eine chromatographische Trennung zwischen 15(R)-IPG F_{2α} und IPG F_{2α} lag trotz einer kurzen Säule und geringer Laufzeit vor. Umgekehrt konnten chromatographisch von IPG F_{2α} unter diesen Bedingungen nicht ausreichend abgetrennte Isomere wie beispielsweise PG F_{2β} oder IPG F_{2β} vollständig durch die differentielle Mobilitätsspektrometrie selektiert werden. Unter Berücksichtigung der optimierten Parameter ergab sich Methode 3 (s. Tab. A.4 auf Seite 166).

6.7. Optimierung der Festphasenextraktion (SPE)

Aufgrund der Referenzbereiche für Isoprostane (s. Tab. 2.2 auf Seite 14) waren geringe Messwerte bis in den niedrigen pg/mL-Bereich zu erwarten. Daher sollte eine Extraktionsmethode mit der Option einer Aufkonzentrierung erarbeitet werden für den Fall, dass die Sensitivität des Messgeräts nicht ausreichen würde. In der verfügbaren Literatur war Festphasenextraktion (SPE) die vorherrschende Aufarbeitungsart für Isoprostane (s. unter 2.6 auf Seite 17), daher wurden zunächst SPE-Verfahren evaluiert.

6.7.1. Evaporationsverhalten

Zur Elution der Analyten von SPE-Kartuschen werden oft angesäuerte oder basische Lösungsmittel verwendet. In der verfügbaren Literatur waren keine Angaben über mögliche Abdampfverluste oder die Notwendigkeit der Verwendung eines Keepers auffindbar. Es war daher zu prüfen, ob

IPG F_{2α} beispielsweise bei saurem pH als Carbonsäure protoniert und daher ungeladen gegenüber Abdampfen unter Stickstoff bis zur Trockene stabil war. Bei Verlusten durch Flüchtigkeit war zu prüfen, ob die Verwendung eines Keepers möglich und nötig war. Dazu wurde IPG F_{2α} aus methanolischer Lösung mit und ohne Zusatz von Ameisensäure unter Stickstoff bis zur Trockene evaporiert. Gleichzeitig wurden entsprechende Versuche unter Zusatz von Keeper-Substanzen durchgeführt (s. Tab. 5.9 auf Seite 40).

Im Vergleich zu einer nicht evaporierten Lösung (Vergleich) zeigte der Zielanalyt IPG F_{2α} beim Abdampfen aus saurer Lösung (MeOH/FA) deutliche Verluste von -46 % (s. Abb. 6.17). Aus rein methanolischer Lösung (MeOH) lagen die Verluste nur bei -16 %, die Verwendung von alkalisierenden Zusätzen als Keeper wie Ammoniak (MeOH + NH₃) zeigte kaum Verluste. Die ungeladene Form des Zielanalyten ist deutlich flüchtiger, daher sollte ein Keeper verwendet werden oder der pH der Lösung vor einer Evaporation in den alkalischen Bereich eingestellt werden.

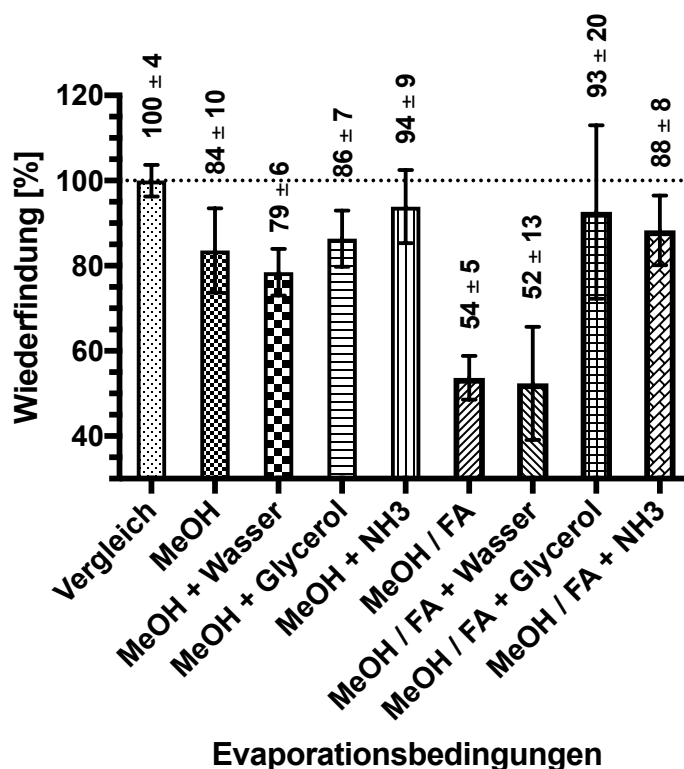


Abb. 6.17.: Darstellung der Wiederfindung von IPG F_{2α} nach Evaporation aus saurer (MeOH/FA) oder neutraler Lösung (MeOH) im Vergleich zu einem nicht abgedampften Standard (Vergleich). Die geprüften Keeper-Substanzen sind nach dem Lösungsmittel mit einem „+“ aufgeführt (beispielsweise MeOH/FA + Glycerol). Aus saurer Lösung (MeOH/FA) zeigen sich deutlich Abdampf-Verluste, welche sich durch die Verwendung eines Keepers (z. B. Glycerol oder Ammoniaklösung) kompensieren lassen.

Die Verwendung von Keeper-Substanzen oder eine Alkalisierung vor dem Abdampfen konnte die beobachteten Verluste effektiv minimieren. Wasser ließ sich als Keeper einfach dosieren, war unter sauren Bedingungen aber nicht effektiv (s. Abb. 6.17 unter MeOH/FA + Wasser). Glycerol war aufgrund seiner Viskosität volumetrisch schwer exakt dosierbar und zeigte im Chromatogramm zusätzliche Signale, welche allerdings deutlich vom Zielanalyten abgetrennt waren. Es bewirkte eine größere Schwankungsbreite der Ergebnisse als die anderen getesteten Keeper. Eine Alkalisierung

des Eluats mittels Ammoniaklösung war ein einfacher und effektiver Weg der Kompensation (s. Abb. 6.17 auf der vorherigen Seite unter MeOH/FA + NH₃). Da die verwendete konzentrierte Ammoniaklösung ca. 25 %ig war, wurde abhängig von der im Eluat vorliegenden Menge Säure ein entsprechend großes Volumen Wasser bei der Alkalisierung des Eluats durch das nötige Volumen an Base eingeschleppt. Insofern war die Änderung des pH-Wertes zwar effektiv, bewirkte aber auch eine Verlängerung der Evaporationszeit aufgrund der dann im Eluat vorliegenden Wassermenge.

Zum Vergleich wurde in einem separaten Versuch die Evaporation bis zur Trockene aus einer ammoniakalischen Lösung getestet, die Verluste lagen hier bei durchschnittlich 10 % (s. Abb. 6.18). Sie waren damit deutlich geringer als bei Verwendung einer angesäuerten Lösung und etwa vergleichbar mit einer nachträglichen Alkalisierung einer sauren Lösung vor der Evaporation.

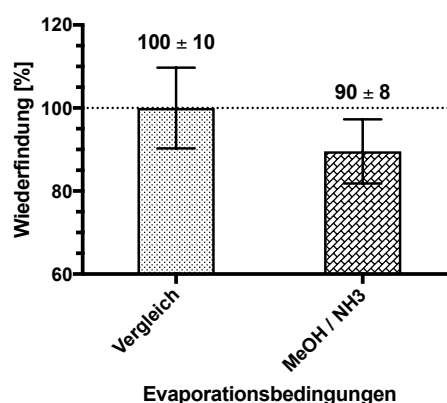


Abb. 6.18.: Darstellung der Wiederfindung von IPG F_{2α} nach Evaporation aus ammoniakalischer Lösung im Vergleich zu einem nicht abgedampften Standard (Vergleich); aus alkalischer Lösung ergeben sich nur geringe Abdampfverluste.

6.7.2. SPE-Sorbentiencreening

Aufgrund der physiko-chemischen Eigenschaften von IPG F_{2α} (s. unter 2.5.5 auf Seite 12) wurden Sorbentien zur Festphasenextraktion (SPE) ausgewählt, welche eine Retention durch unterschiedliche Mechanismen bewirken konnten. Es wurden Umkehrphasen (RP)- und Mixed-Mode (MM)-Kartuschen getestet, jeweils sowohl polymer- wie auch kieselgelbasiert (s. Tab. 6.7). Die Mixed-Mode Säulen bestanden dabei jeweils aus einer Umkehrphase in Kombination mit einem starken Anionentauscher (SAX).

Tab. 6.7.: Eigenschaften der zur Festphasenextraktion getesteten Sorbentien

	Plexa	C18ec	Plexa PAX	Certify II
Art des Sorbens	Polymer	Kieselgel	Polymer	Kieselgel
Retentionstyp	RP	RP	Mixed-Mode	Mixed-Mode
Material	PS/DVB	C18	PS/DVB + SAX	C8 + SAX
Sorbensmenge	60 mg	200 mg	60 mg	200 mg
Partikelgröße	45 µm	45 µm	45 µm	40 µm

Generell zeigen Polymermaterialien den Vorteil einer höheren Kapazität und können daher mit weniger Sorbens arbeiten. Dieses sorgt prinzipiell für eine mögliche Minimierung der einzusetzenden Volumina in den jeweiligen SPE-Schritten (Konditionierung, Waschen, Elution) und daher werden bei vergleichbaren Ergebnissen Polymermaterialien oft bevorzugt. Geringere Elutionsvolumina bedeuten einen Zeitvorteil durch ein schnelleres Einengen unter Stickstoff. Zusätzlich haben Polymersorbentien den Vorteil einer hohen Stabilität gegenüber Trockenlaufen der SPE-Säulen während der Aufarbeitung.

Die Mixed-Mode Sorbentien (Plexa PAX und Certify II) wurden aufgrund der zwei möglichen Retentionsmechanismen unter beiden Bedingungen getestet: im Umkehrphasen (RP)-Modus (Protokoll MM-RP) und im Ionentauschermodus (Protokoll MM-IA). In der realen Anwendung wird meist eine Mischung beider Funktionalitäten verwendet, indem die Mixed-Mode Materialien für eine initiale Retention unter RP-Bedingungen beladen werden, um anschließend im Waschschrift die starke Anionentauscherfunktion zur Wirkung zu bringen. Hier wurden zunächst die einzelnen Retentionsmodi geprüft, um mögliche Unterschiede in der Leistung der SPE-Materialien zu erkennen (s. Abb. 6.19). Erst danach wurde mit der Kombination aus initialer RP-Beladung und anschließender Ionentauscherwirkung weitergearbeitet, damit sollte die beste Aufreinigung erzielt werden können (s. unter 6.7.4 auf Seite 81).

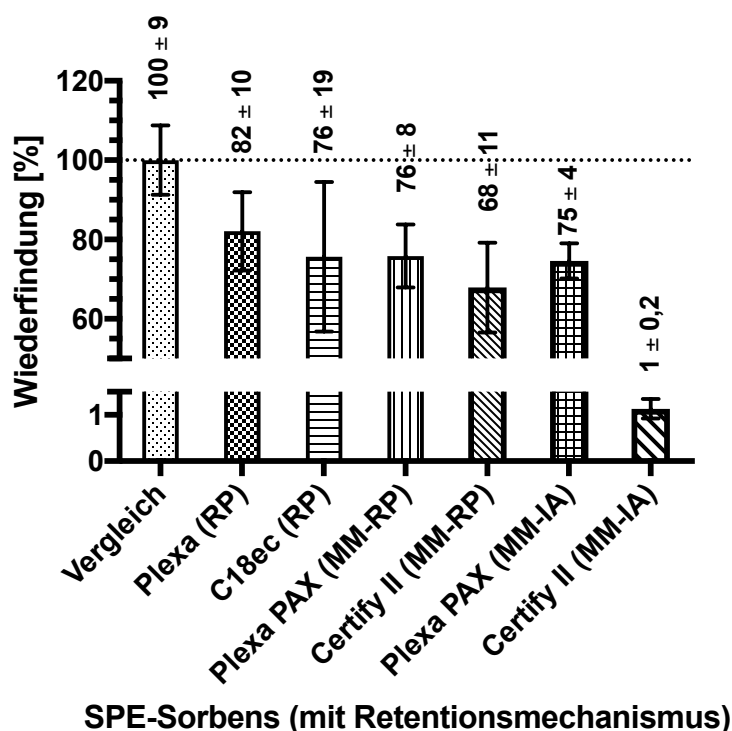


Abb. 6.19.: Darstellung der Wiederfindung von IPG F_{2α} nach Festphasenextraktion (SPE) mit unterschiedlichen SPE-Sorbentien; die Extraktion wurde anhand von generischen Herstellervorschriften zu den jeweiligen Sorbentien durchgeführt. Die Angabe des dabei verwendeten Retentionsmechanismus findet sich in Klammern nach dem Sorbens.

Eine Umkehrphasen (RP)-Retention ist unspezifisch und erinnert an die Theorie einer Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE). Abhängig vom exakten Prozedere werden vorwiegend Substanzen ab einer bestimmten Lipophilie retardiert. Eine Umkehrphase ermöglicht über entsprechende Waschschriffe das Ausspülen von Salzen und polaren Interferenzen, sowie in Abhängigkeit der Stärke von Waschlösung bzw. Elutionsmittel - im Gegensatz zu einer LLE - in gewissen Grenzen die Abtrennung auch

unpolarer Substanzen. Beide Umkehrphasen (Plexa und C18ec) ergaben eine Wiederfindung von > 75 % mit leichten Vorteilen für das Polymermaterial Plexa (82 %) gegenüber dem kieselgelbasierten Material C18ec (76 %). Für diese Säulen fiel zusätzlich die Streuung der Ergebnisse größer aus. Die weitere Optimierung einer RP-SPE wurde deshalb mit Plexa durchgeführt.

Mixed-Mode (MM)-Säulen können mit einem mehrphasigen Prinzip arbeiten: bezüglich Analyten wie Isoprostanen erfolgt unter sauren Bedingungen initial eine Retention der Carbonsäuren über die RP-Funktionalität. Mit den Waschschritten wird der pH-Wert dann ins Neutrale bis Alkalische verschoben. Nun liegen sowohl das Sorbens wie auch der saure Analyt geladen vor, allerdings gegensätzlich (Sorbens positiv, Isoprostane als Carbonsäuren negativ). Aufgrund der starken ionischen Wechselwirkung kann unter diesen Bedingungen nun mit sehr starken Waschlösungen gearbeitet und es können beispielsweise auch neutrale unpolare Substanzen entfernt werden, was auf RP-Phasen nur sehr eingeschränkt möglich ist. Die Elution erfolgt unter sauren Bedingungen, die Isoprostane liegen damit wieder ungeladen vor und können gezielt von der Säule entfernt werden. Diese Art der mehrphasigen Retention sorgt dafür, dass im Falle von Isoprostanen nur Substanzen eluiert werden, die sowohl über unpolare Wechselwirkungen retardierbar sind, als auch über eine Säurefunktionalität verfügen müssen. Alle anderen polaren oder unpolaren Substanzen können unter geeigneten Bedingungen aufgrund des Waschregimes entfernt werden. In den durchgeführten Versuchen wurden die Mixed-Mode Säulen zunächst auf beide Retentionsarten isoliert getestet, mit dem Verfahren MM-RP unter Umkehrphasen-Bedingungen, mit dem Verfahren MM-IA auf die Anionentauscherfähigkeiten hin. Reine Ionentauschersäulen zeigen oft Probleme mit biologischen Materialien wie Urin, da die Ionenstärke dieser Matrices für einen reinen Ionenaustauschvorgang zu hoch ist. Die Salzlast eines Urins kann bei Mixed-Mode Säulen durch die initiale Umkehrphasen-Retention eliminiert werden, erst nach der Entsalzung wird der Ionentauschermodus verwendet um die restliche Matrix ausgiebig zu spülen. Daher haben Mixed-Mode Säulen das Potential zu einer stärkeren und orthogonalen Aufreinigung im Vergleich zu reinen Umkehrphasen.

Die beiden geprüften Mixed-Mode Phasen (Plexa PAX und Certify II) zeigten unter Umkehrphasen-Bedingungen (Protokoll MM-RP) eine ähnliche Wiederfindung (Plexa PAX 76 % und Certify II 68 %) wie die reinen RP-Phasen, obwohl die Mixed-Mode Sorbentien im Vergleich zu den RP-Phasen bei identischer Menge (Plexa und Plexa PAX jeweils 60 mg bzw. C18ec und Certify II jeweils 200 mg, s. Tab. 6.7 auf Seite 77) neben der RP-Eigenschaft auch noch zusätzlich mit einer starken Anionentauscherfunktionalität ausgestattet waren. Auch hier war die Streuung beim Kieselgelmaterial Certify II MM-RP größer als bei den Polymersäulen Plexa PAX MM-RP. Im reinen Ionentauschermodus (Protokoll MM-IA) waren die Resultate deutlich abweichend. Die Wiederfindung von Plexa PAX MM-IA (75 %) entsprach derjenigen unter RP-Bedingungen (Plexa PAX MM-RP, 76 %), während bei Certify II MM-IA (1 %) ein fast völliger Verlust des Analyten auftrat. Die weitere Optimierung einer Mixed-Mode SPE wurde deshalb mit Plexa PAX durchgeführt.

6.7.3. SPE-Optimierung: Umkehrphase (RP)

Zu Beginn der Optimierung wurde ein SPE-Profil erstellt, aus welchem sowohl die nötige Mindeststärke des Elutionsmittels wie auch die maximale Stärke der Waschlösung abgelesen werden konnte. Zur Erstellung dieses Profils wurden die vorbereiteten SPE-Säulen mit Substanz beladen und dann direkt eluiert, es wurde auf einen Waschschriff verzichtet. Dieser Vorgang konnte sowohl als Elution wie auch als Waschen bewertet werden. Anschließend wurde zunächst die Elution geprüft und erst zum Schluss der Optimierung die Waschbedingungen festgelegt. Aus Gründen der Verfügbarkeit, Toxizität und Preis wurde eine Bearbeitung der Festphasenextraktion (SPE) mit Methanol angestrebt und daher das Waschprofil mit methanolischen Lösungen erstellt. Lediglich zur Elution wurde als Vergleich auch Acetonitril getestet.

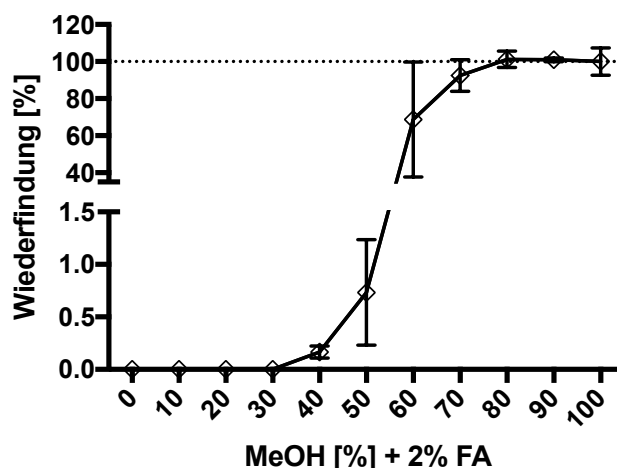


Abb. 6.20.: Darstellung der Wiederfindung von IPG F_{2α} bei der Optimierung des Anteils organischer Phase in der Wasch- bzw. Elutionslösung (Angabe in % (v/v)).

Gemäß dem Waschprofil (s. Abb. 6.20) war es möglich, die beladene SPE-Säule Plexa mit bis zu 40 % (v/v) angesäuertem Methanol zu waschen. Der Analytverlust betrug unter diesen Bedingungen weniger als 0,5 %. Für eine möglichst vollständige Elution waren mindestens 80 % (v/v) angesäuertes Methanol nötig.

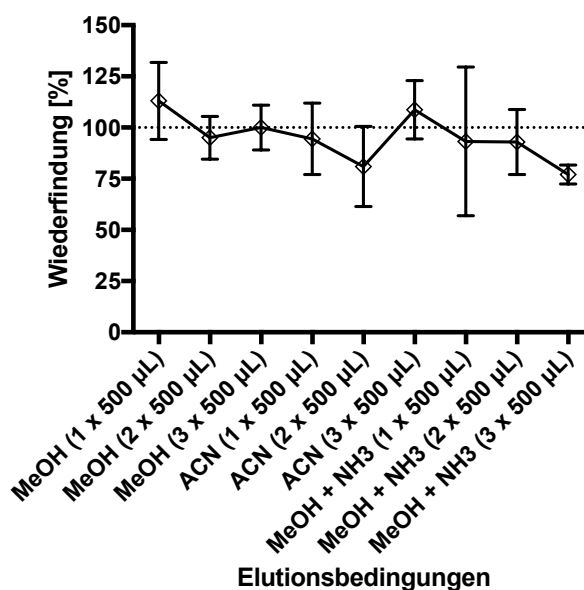


Abb. 6.21.: Darstellung der Wiederfindung von IPG F_{2α} bei der Optimierung von Zusammensetzung und Volumen des Elutionsmittels.

Die unter den verschiedenen Elutionsbedingungen erhaltenen Wiederfindungen waren im Wesentlichen vergleichbar (s. Abb. 6.21). Eine Verwendung von Acetonitril oder einem alkalischen Lösungsmittel zur Elution zeigte bezüglich der Wiederfindung im Vergleich zu Methanol keine Vorteile, eine mehrfache Elution ergab dabei meist geringere Schwankungen als eine einfache Elution. Es wurde mit einer zweifachen Elution mit je 500 µL Methanol weiter gearbeitet.

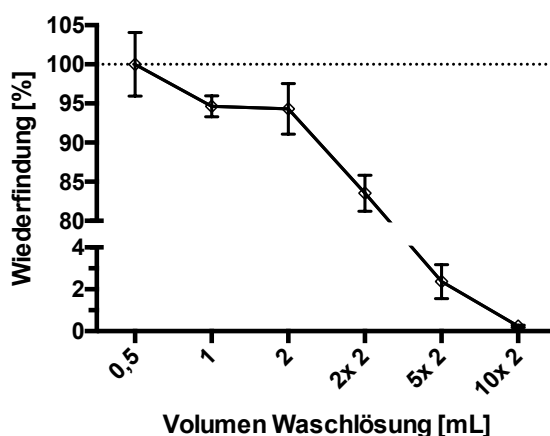


Abb. 6.22.: Darstellung der Wiederfindung von IPG F_{2α} bei der Optimierung des Volumens der Waschlösung (40 % (v/v) MeOH + 2 % FA).

Bezogen auf einen Waschschriff mit 500 µL einer Lösung von 40 % (v/v) angesäuertem Methanol zeigten sich bei der Verwendung von 1 mL bzw. 2 mL Waschvolumen kaum Unterschiede in der Wiederfindung (95 % bzw. 94 %, s. Abb. 6.22). Erst bei größeren Waschvolumina wie 2x 2 mL sank die Wiederfindung auf 84 % ab, bis schließlich bei 5x 2 mL noch 2 % und bei 10x 2 mL nur 0,2 % Wiederfindung vorlagen. Der Waschschriff wurde auf 2 mL mit 40 % (v/v) angesäuertes Methanol festgelegt. Aus der Optimierung anhand von Standardlösungen ergab sich damit das in Tabelle 6.8 angegebene SPE-Protokoll für das RP-Polymersorbens Plexa.

Tab. 6.8.: Protokoll der optimierten Methode für das RP-Sorbens Plexa

SPE-Schritt	Beschreibung	Volumen [mL]
Probenvorbereitung	Verdünnung mit 2 % FA	1 + 1
Konditionierung	MeOH	2
Equilibrierung	2 % FA	2
	mit vorbereiteter Probe beladen	
Waschen	40 % MeOH + 2 % FA per Schwerkraft, dann trocknen (Zentrifuge 5 min bei 3000 RCF)	2
Elution	MeOH Elution per Schwerkraft, dann Zentrifuge 5 min bei 3000 RCF	2x 0,5

Alle prozentualen Angaben beziehen sich auf (v/v).

6.7.4. SPE-Optimierung: Mixed-Mode

Auch hier wurde zunächst ein SPE-Profil (s. Abb. 6.23 auf der nächsten Seite) jeweils bei saurer oder neutraler Beladung (s. Tab. 5.14 auf Seite 44 zu den Protokollen) erstellt. Die Profile zeigten bezogen auf die mittlere Wiederfindung keine relevanten Unterschiede. Unabhängig davon welcher Anteil Methanol im Waschschriff eingesetzt wurde, lag die Wiederfindung zwischen ca. 85-115 %. Aufgrund dieser Daten schien der Einsatz von 100 % Methanol gerechtfertigt, ohne dass der aufgebene Analyt IPG F_{2α} von der SPE Säule gewaschen wurde.

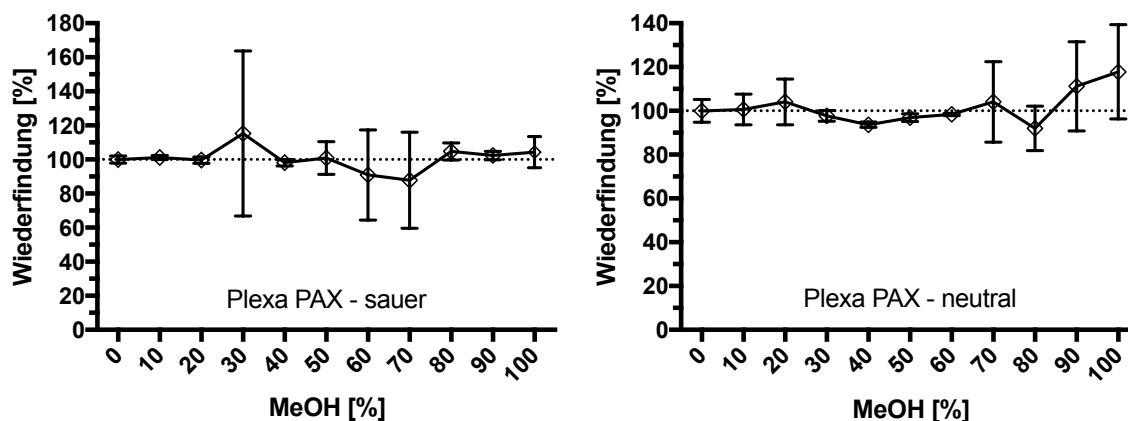


Abb. 6.23.: Darstellung der Wiederfindung von IPG F_{2α} bei der Optimierung des Anteils organischer Phase in der Wasch- bzw. Elutionslösung bei saurer (links) bzw. neutraler (rechts) Beladung (Angabe in % (v/v)).

Nach dem ersten Waschschrift lagen Sorbens und Zielanalyt entgegengesetzt geladen vor und die Ionentauscherfähigkeit wurde aktiv. Die Bindung war dann so stark, dass sie auch durch reines Methanol nicht gebrochen wurde. Dieses ermöglichte einen deutlich stärkeren Waschschrift als unter Umkehrphasen (RP)-Bedingungen, dort war ein Anteil von maximal 40 % (v/v) Methanol zum Waschen möglich. Dieser starke Waschschrift konnte Neutralmoleküle und basische Substanzen wegwaschen, nur saure Substanzen verblieben auf der Säule. Dieses Ergebnis entsprach der Theorie, nach der beide Retentionsmechanismen Umkehrphase (RP) und starker Anionentausch (SAX) gleichzeitig gebrochen werden mussten, um eine Elution zu erreichen, z. B. durch die Verwendung von Methanol (gegen die RP-Bindung) und Säure (gegen den starken Anionenaustauscher) gemeinsam. Eine angesäuerte (wässrige) Lösung alleine oder reines Methanol reichten für eine Elution nicht aus, nur eine Kombination beider Bedingungen führte zum Lösen der Bindungen. Für beide Beladungsprotokolle - sauer und neutral - konnte mit 100 % Methanol gewaschen werden um andere Substanzen vom Zielmolekül abzutrennen.

Auch hier wurden anschließend an die Erstellung eines SPE-Profiles zunächst die Elutionsbedingungen optimiert. Die dabei erhaltenen Wiederfindungsraten waren im Wesentlichen nicht different (s. Abb. 6.24 auf der nächsten Seite). Als Säurezusatz erwiesen sich 2 % (v/v) Ameisensäure als ausreichend. Die Verwendung von weniger Säure bedeutet auch weniger Wassereinschleppung in das Eluat, da weniger Ammoniaklösung zur Alkalisierung vor dem Abdampfen nötig war, dieses verkürzte die Evaporationszeit. Acetonitril als ein stärkeres Elutionsmittel wurde nicht getestet, der RP-Anteil der Mixed-Mode Phase Plexa PAX besteht aus dem gleichen Material wie bei Plexa. Dort (s. Abb. 6.21 auf Seite 80) wurde bereits gezeigt, dass Methanol zur Elution ausreichend und eine Verwendung von Acetonitril nicht nötig war. In Anlehnung an die Umkehrphasen-SPE wurde eine zweifache Elution mit jeweils 500 µL Methanol + 2 % (v/v) Ameisensäure für beide Protokolle verwendet.

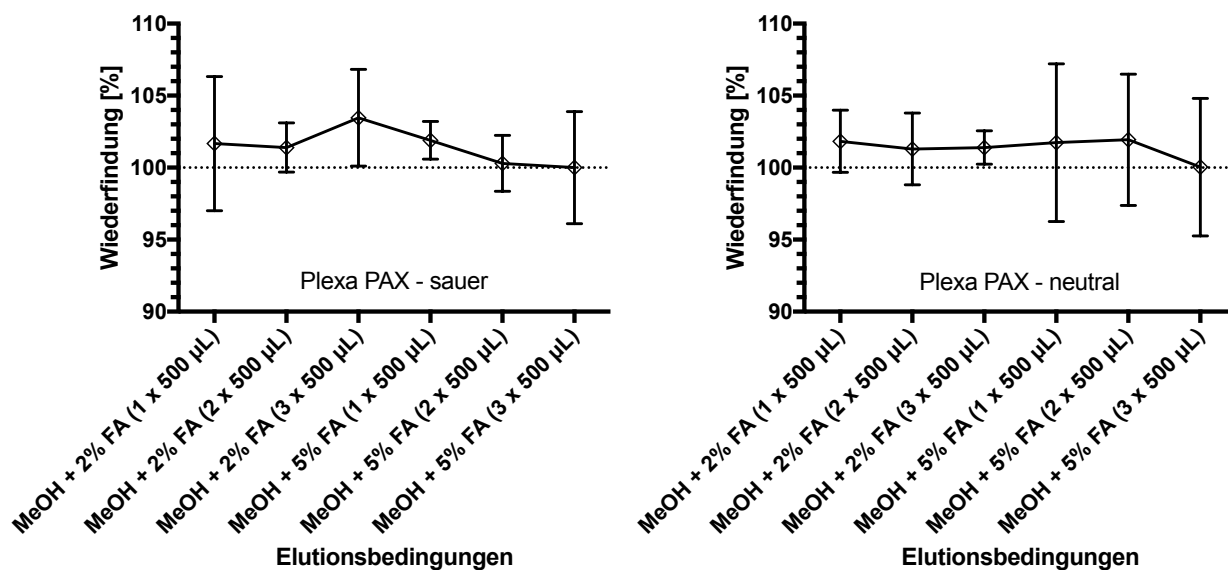


Abb. 6.24.: Darstellung der Wiederfindung von IPG F_{2α} bei der Optimierung von Zusammensetzung und Volumen des Elutionsmittels bei saurer (links) bzw. neutraler (rechts) Beladung.

Anschließend folgte die Optimierung des zweiten Waschschruttes, der erste Waschschrut zur Änderung des pH-Millieus entspricht den Herstellerangaben und wurde nicht verändert. Bezogen auf einen Waschrut mit 500 µL Methanol zeigten sich in der Wiederfindung bei der Verwendung von 1 mL bis zu 10x 2 mL Waschrutvolumen keine relevanten Unterschiede (s. Abb. 6.25). Tatsächlich lag die Wiederfindung durchgehend bei ca. 90-110 %, auch beim größten getesteten Waschrutvolumen von 10x 2 mL Methanol wurde eine Wiederfindung von 95 % (sauer) bzw. 92 % (neutral) ermittelt.

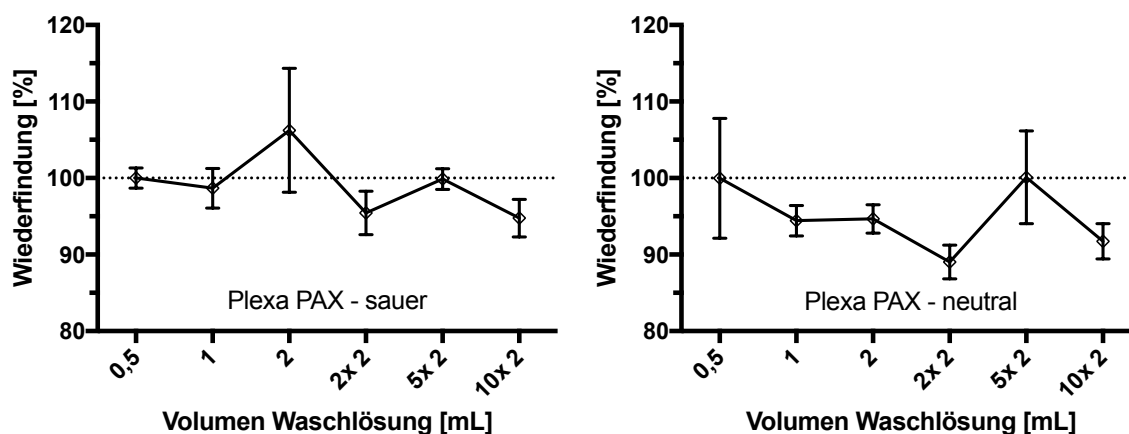


Abb. 6.25.: Darstellung der Wiederfindung von IPG F_{2α} bei der Optimierung des Volumens der Waschrutung (Methanol) bei saurer (links) bzw. neutraler (rechts) Beladung.

Die starke ionische Bindung wurde auch bei großen Waschrutvolumina nicht gebrochen und der Analyt nicht von der Säule gespült. Dazu war es nötig beide Bindungsarten (unpolar und ionisch) zu unterbrechen, eine Elution war nur mit starken Lösungsmitteln und der gleichzeitigen Verwendung von einem Säurezusatz möglich. Analog zur Plexa-Methode wurde der Waschrut für beide Plexa

PAX-Varianten aus Gründen der Praktikabilität auf ein Volumen von 2 mL festgelegt. Aus den durchgeführten Optimierungen ergaben sich die in Tabelle 6.9 angegebenen SPE-Protokolle für das Mixed-Mode-Polymersorbens Plexa PAX.

Tab. 6.9.: Protokolle der optimierten Methoden für das Mixed-Mode Sorbens Plexa PAX

SPE-Schritt	Protokoll A - sauer	Protokoll B - neutral	Volumen [mL]
Probenvorbereitung	2 % FA	NH ₄ Ac*	1 + 1
Konditionierung	MeOH		2
Equilibrierung	2 % FA mit vorbereiteter Probe beladen	NH ₄ Ac*	2
Waschen 1	5 % NH ₄ OH	NH ₄ Ac*/MeOH (95/5) per Schwerkraft	2
Waschen 2	MeOH per Schwerkraft, dann trocknen (Zentrifuge 5 min bei 3000 RCF)		2
Elution	MeOH + 2 % FA Elution per Schwerkraft, dann Zentrifuge 5 min bei 3000 RCF		2x 0,5

Alle prozentualen Angaben oder Mischungen wie (95/5) beziehen sich auf (v/v).

* NH₄Ac, 50 mM, pH 7

6.7.5. SPE Vergleich - Umkehrphase (Sorbens Plexa) / Mixed-Mode (Sorbens Plexa PAX)

Die beiden Arten von Festphasenextraktionen (Umkehrphase und Mixed-Mode) wurden mit den auf den jeweiligen Säulen optimierten Protokollen (s. Tab. 6.8 auf Seite 81 und Tab. 6.9) einem direkten Vergleich anhand der Analyse von realen Urinproben unterzogen. Durch eine unphysiologisch hohe zusätzliche Dotierung von 10 ng/mL IPG F_{2α} war der zu erwartende Basallevel des Urins für die quantitativen Aussagen nicht relevant. Der interne Standard IPG F_{2α}-D4 wurde bei diesen Versuchen erst nach der Extraktion zugesetzt. Dadurch sollte eine möglicherweise im Massenspektrometer durch Bestandteile der Urinmatrix auftretende Ionensuppression kompensiert werden. Zwecks Vergleich der Extraktionen sollten Verluste aus der Festphasenextraktion (SPE) hingegen bewusst nicht durch den internen Standard ausgeglichen werden. Die so ermittelten Wiederfindungsraten im Vergleich zu einem nicht extrahierten IPG F_{2α}-Standard (100 %-Vergleichswert) waren 98 % für Plexa (RP-Modus), 89 % für Plexa PAX sauer (Mixed-Mode bei saurer Beladung) und 92 % für Plexa PAX neutral (Mixed-Mode mit neutraler Beladung). Die Extraktionsverluste lagen demnach bei 2-11 %. Sie waren gleichzeitig ein Maß für die Extraktionsausbeute (Extraktionseffizienz), die unter den verwendeten Bedingungen bei 89-98 % lag (s. Abb. 6.26 auf der nächsten Seite). Der interne Standard wurde nach der Extraktion zugefügt und konnte Extraktionsverluste nicht ausgleichen, wohl aber Suppressionseffekte.

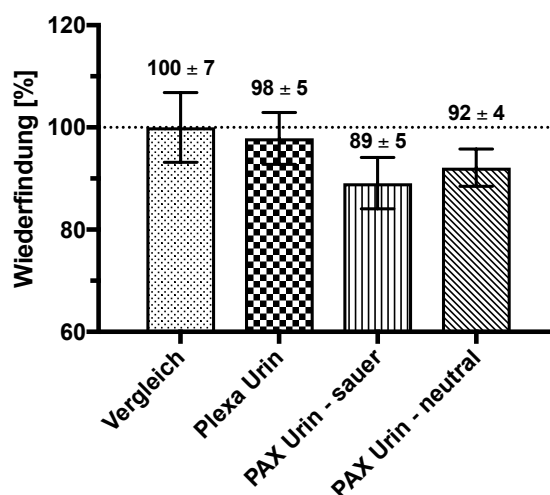


Abb. 6.26.: Darstellung der Wiederfindung von IPG F_{2α} als Maß der Extraktionseffizienz im Vergleich unterschiedlicher SPE-Methoden anhand eines Realurins. Dabei wurden die Sorbentien Plexa und Plexa PAX (mit saurer und neutraler Beladung) mit einer nicht extrahierten Standardlösung als Sollwert verglichen. Die Auswertung erfolgte über den nach der SPE zugesetzten internen Standard und kompensierte daher Suppressionseffekte, nicht aber Extraktionsverluste.

Eine Auswertung derselben Analysen aber ohne Berücksichtigung des internen Standards hingegen zeigte die Wiederfindung bezogen auf die Methodeneffizienz (den kombinierten Effekt von Extraktionsverlusten und Ionensuppression) an (s. Abb. 6.27). Die Wiederfindung war bei Plexa mit 37 % am geringsten, bei Plexa PAX sauer mit 44 % und Plexa PAX neutral mit 40 % etwas höher. Diese Versuche zeigten allerdings auch, dass unter allen SPE-Protokollen trotz effizienter Analytextraktion ein ausgeprägter Suppressionseffekt im Massenspektrometer vorliegt.

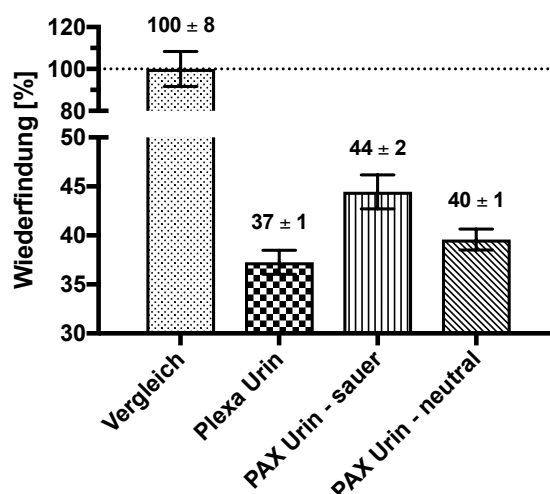


Abb. 6.27.: Darstellung der Wiederfindung von IPG F_{2α} als Maß der Methodeneffizienz im Vergleich unterschiedlicher SPE-Methoden anhand eines Realurins. Dabei wurden die Sorbentien Plexa und Plexa PAX (mit saurer und neutraler Beladung) mit einer nicht extrahierten Standardlösung als Sollwert verglichen. Die Auswertung erfolgte nicht über den internen Standard, daher werden Extraktionsverluste und Suppressionseffekte nicht kompensiert.

Da der interne Standard nach der Festphasenextraktion zugesetzt wurde und somit keinen potentiellen Extraktionsverlusten unterlag, konnte aus dessen Auswertung im Vergleich zu einem nicht extrahierten Standard direkt auf den reinen Matrixeffekt geschlossen werden (s. Abb. 6.28).

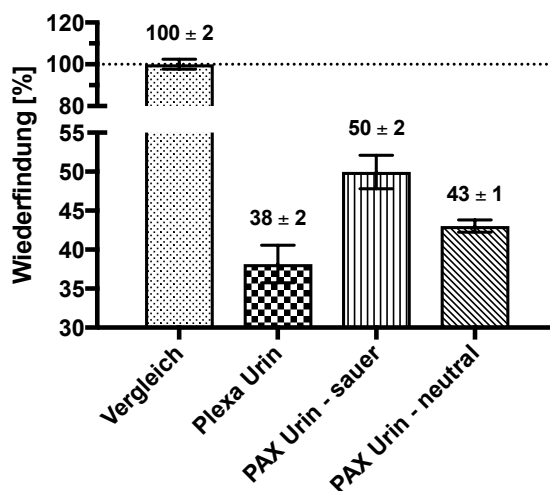


Abb. 6.28.: Darstellung der Wiederfindung des internen Standards IPG F_{2α}-D4 als Maß für den Matrixeffekt im Vergleich unterschiedlicher SPE-Methoden anhand eines Realurins. Dabei wurden die Sorbentien Plexa und Plexa PAX (mit saurer und neutraler Beladung) mit einer nicht extrahierten Standardlösung als Sollwert verglichen. Der interne Standard wurde nach der Extraktion zugesetzt und unterlag daher keinen Extraktionsverlusten. Die Wiederfindung des internen Standards ist in diesem Fall ein direktes Maß für den Matrixeffekt.

Die Wiederfindung des internen Standards war bei Plexa mit 38 % am geringsten, bei Plexa PAX sauer lag sie mit 50 % bzw. bei Plexa PAX neutral mit 43 % etwas höher. Das RP-Sorbens Plexa zeigte demnach die höchste Signalsuppression im Vergleich der SPE-Aufarbeitungen.

Die getesteten SPE-Verfahren zeigten eine effektive Exktraktion mit nur geringen Verlusten, dafür aber starke Suppressionseffekte durch die Matrix. Die Extraktionen wurden auf verschiedenen SPE-Sorbentien mit unterschiedlichen und orthogonalen Retentionsmechanismen optimiert und Protokolle mit möglichst starken Waschschritten verwendet. Dennoch zeigten sich starke Matrixeinfüsse, obwohl die Extrakte nach einer Evaporation nicht weiter aufkonzentriert, sondern in einem Volumen entsprechend der eingesetzten Matrix aufgenommen wurden. Eine teilweise deutliche Aufkonzentrierung zur Steigerung der Sensitivität ist gemäß der verfügbaren Literatur in der Isoprostananalytik üblich und möglicherweise aufgrund der geringen zu messenden Konzentrationen an IPG F_{2α} nötig. Es war zweifelhaft, ob die im niedrigen pg/mL-Bereich liegenden zu erwartenden IPG F_{2α}-Konzentrationen von Urinen mit diesem Verfahren sicher und präzise gemessen werden könnten. Aufgrund der hier beschriebenen ausgeprägten Ionensuppressionseffekte im Detektor durch unbekannte Bestandteile der Urinmatrix wurde daher ein weiteres Probenvorbereitungsverfahren - Festphasen-unterstützte Flüssigextraktion als eine moderne Variante der Flüssig-Flüssig-Extraktion - ausgetestet.

6.8. Optimierung der Festphasen-unterstützten Flüssigextraktion (SLE)

Als einfache Alternative zur Festphasenextraktion (SPE) bietet sich eine Festphasen-unterstützte Flüssigextraktion (SLE, supported liquid extraction) an (s. unter 5.8 auf Seite 46). Diese wurde unter Verwendung von SLE-Kartuschen mit verschiedenen Lösungsmitteln (Ethylacetat, tert. Butylmethylether und n-Hexan) getestet. Im Vergleich der potentiellen Extraktionslösungsmittel (s. Abb. 6.29) zeigte sich zwischen Ethylacetat mit 90 % Wiederfindung und tBME mit 89 % Wiederfindung kein relevanter Unterschied in der Extraktionsausbeute bezogen auf eine nicht-extrahierte Standardlösung. Unter diesen Bedingungen ergab n-Hexan eine Wiederfindung von 0,2 %. Für eine Extraktion von IPG F_{2α} mittels SLE war n-Hexan nicht geeignet, Ethylacetat und tBME zeigten eine hohe Extraktionsfähigkeit. Als sehr unpolares Lösungsmittel kann n-Hexan aber eventuell zu einer Vorreinigung verwendet werden um stark lipophile Substanzen abzutrennen und zu entfernen, falls das nötig sein sollte.

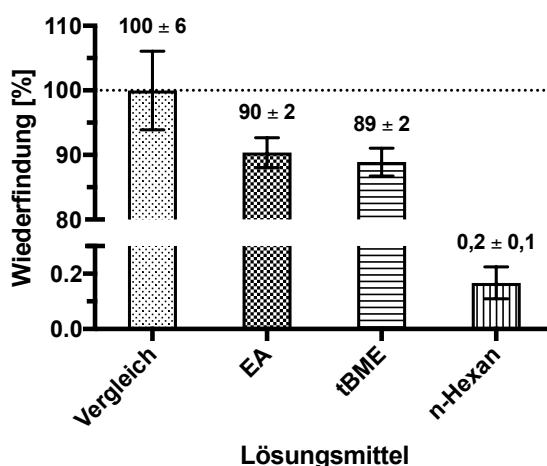


Abb. 6.29.: Darstellung der Wiederfindung von IPG F_{2α} nach SLE mit den Lösungsmitteln Ethylacetat (EA), tert. Butylmethylether (tBME) und n-Hexan im Vergleich zu einer nicht extrahierten Standardlösung.

Für die weiteren Versuche wurde tBME als Lösungsmittel gewählt. Es ist unpolarer als Ethylacetat, bindet daher weniger Wasser und zeigt eine geringere Extraktion von stärker polaren Begleitstoffen. Als Ether lässt sich tBME sehr einfach und schnell evaporieren. SLE benötigt keine üblichen SPE-Schritte wie Konditionieren der Kartusche oder Waschen. Daher war nur das zur Elution verwendete Volumen an Lösungsmittel zu optimieren. Bei den Versuchen dazu war eine Elution mit 1x 5 mL tBME bezogen auf die Wiederfindung der stärksten Elution mit 3x 5 mL zwar ausreichend, zeigte aber eine deutlich stärkere Streuung der Ergebnisse als bei einer Mehrfachelution (s. Abb. 6.30 auf der nächsten Seite). Die Verwendung von 2x 5 mL tBME ergab die reproduzierbarsten Ergebnisse bei hoher Wiederfindung. Die Verwendung von mehr Lösungsmittel bedeutet neben größeren Abfallmengen eine längere Zeit für die Extraktion sowie die folgende Evaporation.

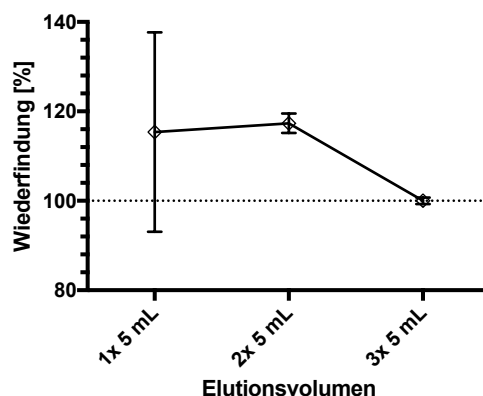


Abb. 6.30.: Darstellung der Wiederfindung von IPG F_{2α} bei der Optimierung des Volumens von tert. Butylmethylether (tBME) zur Elution.

Daher wurde mit einer zweifachen Elution mit je 5 mL tBME weitergearbeitet. Eine Festphasen-unterstützte Flüssigextraktion (SLE) entspricht der Theorie einer Flüssig-Flüssig-Extraktion (s. unter 5.8 auf Seite 46). Da mit einem unpolaren Lösungsmittel extrahiert wurde, sollte die Zielsubstanz möglichst in ungeladener Form vorliegen. Hierzu gelten üblicherweise zwei pH-Einheiten Abstand zum pKs-Wert der zu extrahierenden Substanz als ausreichend. Im Fall des Analyten IPG F_{2α} lag eine Carbonsäure mit einem pKs-Wert von 4,36 vor (s. Tab. 2.1 auf Seite 12). Idealerweise sollte der für die SLE verwendete Urin daher zur möglichst vollständigen Extraktion auf einen pH-Wert von ≤ 2 eingestellt werden. Die bisherigen Versuche wurden an angesäuerten wässrigen Standards durchgeführt, bei der Extraktion von Realurinen per SLE ist jedoch bezüglich der pH-Einstellung die Pufferwirkung der Matrix zu berücksichtigen. Die Ergebnisse der pH-Wert-Messungen eines mit Modifikatoren 1 + 1 verdünnten Realurins wurden in Tabelle 6.10 dargestellt.

Tab. 6.10.: Einfluss von Säuremodifikatoren auf den pH-Wert eines Realurins

Modifikator	theoretischer pH-Wert des Modifikators	gemessener pH-Wert des modifizierten Urins
Urin (nativ)	-	5,29
Wasser	7	5,40
1 % Ameisensäure	2,21	2,96
2 % Ameisensäure	2,06	2,73
5 % Ameisensäure	1,86	2,37
10 % Ameisensäure	1,70	2,08
1N Salzsäure	0	0,63
2N Salzsäure	-0,30	0,31

Die Berechnung der theoretischen pH-Werte der Modifikatoren erfolgte mit WolframAlpha (zuletzt abgerufen am 13.10.2016 unter www.wolframalpha.com). Unter den gewählten Voraussetzungen, also einer 1 + 1 Verdünnung eines Realurins mit einer Säurelösung, war die Verwendung von 5 % Ameisensäure ausreichend, um den pH-Wert auf unter 2,4 zu senken. Dieser Versuch wurde an einem nativ leicht sauren Urin durchgeführt. Urine können nativ allerdings auch alkalisch reagieren, somit erschien die Verwendung einer stärkeren Säure gerechtfertigt. Ameisensäure hat den Vorteil der Flüchtigkeit und ist damit LC-MS kompatibel, andererseits wurde die SLE mit einem organischen

und mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel durchgeführt, somit sollten kaum Säure oder nicht flüchtige Salze in den Extrakt gelangen. Als kommerziell verfügbares Produkt lag 2N Salzsäure im Labor vor und wurde als starke anorganische Säure zur Modifikation des pH-Wertes verwendet. Aus der durchgeführten Optimierung ergab sich das in Tabelle 6.11 angegebene SLE-Protokoll.

Tab. 6.11.: Protokoll der optimierten SLE-Methode

SLE-Schritt	Beschreibung	Volumen [mL]
Probenvorbereitung	Verdünnung mit 2N Salzsäure mit vorbereiteter Probe beladen 5 min warten	1 + 1
Elution	tBME	2x 5

6.8.1. SLE Vergleich - Ethylacetat / tert. Butylmethylether

Die Festphasen-unterstützte Flüssigextraktion (SLE) wurde mit der optimierten Methode (s. Tab. 6.11) unter Verwendung der Extraktionsmittel Ethylacetat (EA) bzw. tert. Butylmethylether (tBME) einem direkten Vergleich anhand der Analyse von realen Urinproben unterzogen. Durch die unphysiologisch hohe zusätzliche Dotierung von 10 ng/mL IPG F_{2α} war der zu erwartende Basallevel des Urins für die quantitativen Aussagen nicht relevant. Der interne Standard IPG F_{2α}-D4 wurde hierbei erst nach der Extraktion zugesetzt. Dadurch sollte eine möglicherweise im Massenspektrometer durch Bestandteile der Urinmatrix auftretende Ionensuppression kompensiert werden. Zwecks Vergleich der Extraktionen sollten Verluste aus der SLE hingegen bewusst nicht durch den internen Standard ausgeglichen werden. Die so ermittelten Wiederfindungsraten im Vergleich zu einem nicht extrahierten IPG F_{2α}-Standard (100 %-Vergleichswert) waren 103 % für Ethylacetat und 100 % für tert. Butylmethylether, Extraktionsverluste lagen nicht vor (s. Abb. 6.31). Die Wiederfindungen waren gleichzeitig ein Maß für die Extraktionsausbeute (Extraktionseffizienz), die unter den verwendeten Bedingungen nahezu vollständig war (s. Abb. 6.31). Der interne Standard wurde nach der Extraktion zugefügt und konnte Extraktionsverluste nicht ausgleichen, wohl aber Suppressionseffekte.

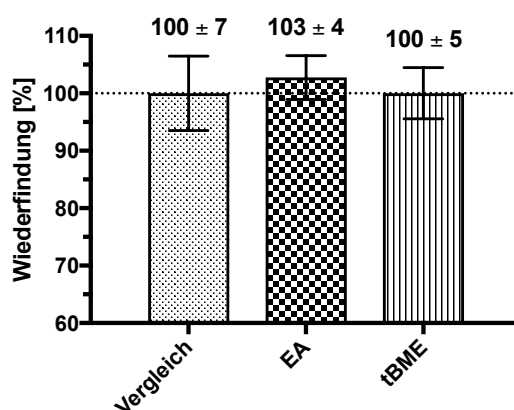


Abb. 6.31.: Darstellung der Wiederfindung von IPG F_{2α} als Maß der Extraktionseffizienz der SLE im Vergleich unterschiedlicher Lösungsmittel anhand eines Realurins (EA: Ethylacetat, tBME: tert. Butylmethylether). Als Sollwert-Vergleich wurde eine nicht extrahierte Standardlösung verwendet. Die Auswertung erfolgte über den nach der SLE zugesetzten internen Standard und kompensierte daher Suppressionseffekte, nicht aber Extraktionsverluste.

Eine Auswertung derselben Analysen aber ohne Berücksichtigung des internen Standards zeigte die Wiederfindung bezogen auf die Methodeneffizienz (den kombinierten Effekt von Extraktionsverlusten und Ionensuppression) an (s. Abb. 6.32). Die Wiederfindung war bei Ethylacetat mit 39 % etwas geringer als bei tert. Butylmethylether mit 42 %. Diese Extraktionen waren in der Methodeneffizienz vergleichbar mit den vorher getesteten SPE-Verfahren (s. unter 6.7.5 auf Seite 84). Diese Versuche zeigten allerdings auch, dass bei der SLE mit beiden Lösungsmitteln trotz effizienter Analytextraktion ein ausgeprägter Suppressionseffekt im Massenspektrometer vorlag.

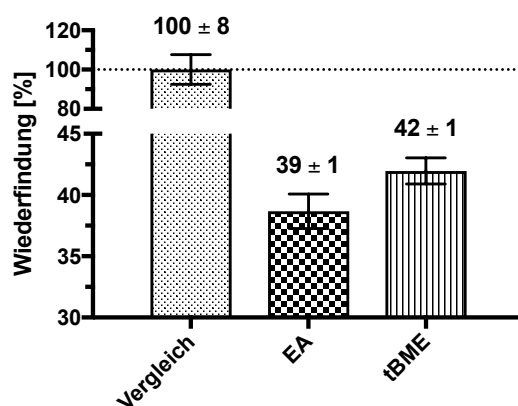


Abb. 6.32.: Darstellung der Wiederfindung von IPG $F_{2\alpha}$ als Maß der Methodeneffizienz der SLE im Vergleich unterschiedlicher Lösungsmittel anhand eines Realurins (EA: Ethylacetat, tBME: tert. Butylmethylether). Als Sollwert-Vergleich wurde eine nicht extrahierte Standardlösung verwendet. Die Auswertung erfolgte nicht über den internen Standard, daher werden Extraktionsverluste und Suppressionseffekte nicht kompensiert.

Da der Interne Standard nach der SLE-Extraktion zugesetzt wurde, konnte aus dessen Auswertung im Vergleich zu einem nicht extrahierten Standard direkt auf den reinen Matrixeffekt geschlossen werden (s. Abb. 6.33).

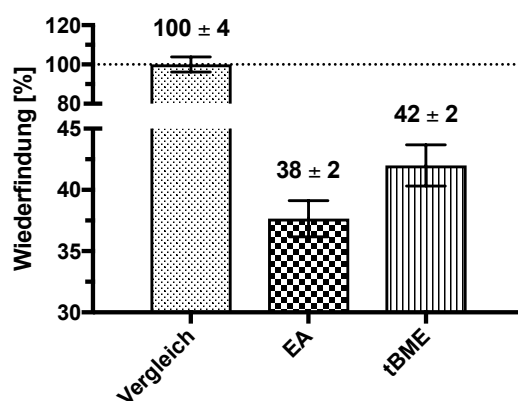


Abb. 6.33.: Darstellung der Wiederfindung des internen Standards IPG $F_{2\alpha}$ -D4 als Maß für den Matrixeffekt der SLE im Vergleich unterschiedlicher Lösungsmittel anhand eines Realurins (EA: Ethylacetat, tBME: tert. Butylmethylether). Als Sollwert-Vergleich wurde eine nicht extrahierte Standardlösung verwendet. Der interne Standard wurde nach der Extraktion zugesetzt und unterlag daher keinen Extraktionsverlusten. Die Wiederfindung des internen Standards ist in diesem Fall ein direktes Maß für den Matrixeffekt.

Die Wiederfindung des internen Standards war bei Ethylacetat mit 38 % geringer als bei tert. Butylmethylether mit 42 %. Ethylacetat zeigte in diesem Vergleich eine etwas höhere Signalsuppression. Die hier beschriebenen Ionensuppressionen ergaben keine Verbesserung zu den Ergebnissen nach SPE (s. unter 6.7.5 auf Seite 84), weshalb diese Probenvorbereitung (SLE) ebenso aufgegeben wurde. Auch hier wurden die Extrakte nach einer Evaporation nicht weiter aufkonzentriert, sondern in einem Volumen entsprechend der eingesetzten Matrix aufgenommen. Eine teilweise deutliche Aufkonzentrierung zur Steigerung der Sensitivität ist gemäß der verfügbaren Literatur in der Isoprostananalytik üblich und möglicherweise aufgrund der geringen zu messenden Konzentrationen an IPG $F_{2\alpha}$ nötig. Es war zweifelhaft, ob die im niedrigen pg/mL-Bereich liegenden zu erwartenden IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen von Urinen mit diesem Verfahren sicher und präzise gemessen werden konnten.

In den durchgeführten Versuchen konnte die Ionensuppression nicht über eine Extraktion (SPE oder SLE) reduziert werden. Eine Option zur Verringerung der Suppressionseffekte war eine Veränderung der Chromatographie. Aufgrund der hier beschriebenen ausgeprägten Ionensuppressionseffekte durch die Urinmatrix wurde Dilute & Shoot als ein in der klinischen Chemie weit verbreitetes und übliches Probenvorbereitungsverfahren (s. unter 6.9) mit einer veränderten Chromatographie evaluiert.

6.9. Dilute & Shoot

Die Extraktionsversuche mittels Festphasenextraktion (SPE, s. unter 6.7 auf Seite 75) und Festphasen-unterstützter Flüssigextraktion (SLE, s. unter 6.8 auf Seite 87) kamen zu fast gleichwertigen Ergebnissen: gute Extraktionseffizienz aber starke Suppressionseffekte. Diese Matrixeffekte waren schon bei Proben stark ausgeprägt, welche nach der Extraktion nicht weiter aufkonzentriert wurden. Es war zu erwarten, dass eine weitere Aufkonzentrierung die Suppressionseffekte zusätzlich weiter verstärken würde und daher nicht vorteilhaft wäre. Ob eine Messung des endogenen Niveaus von beliebigen und gerade auch gering konzentrierten Urinen auf diese Art möglich sein würde, war daher zweifelhaft. Als Alternative wurde ein Dilute & Shoot-Ansatz unter einer veränderten Chromatographie evaluiert (zu den Veränderungen s. Tab. 5.20 auf Seite 48). In den Proof-of-Concept Versuchen war bei einer Direktinjektion bereits ab dem ersten Versuch mit einem nicht dotierten Testurin (ein Eigenurin) der Zielanalyt IPG $F_{2\alpha}$ auf endogenem Niveau deutlich messbar (s. Abb. 6.34 auf der nächsten Seite). Allerdings zeigte sich ein co-eluierendes Signal bei der Analyse von Realmatrix ($R_t = 12,62$ min in Abb. 6.34 auf der nächsten Seite), welches nicht durch das Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Modul SelexION selektiert wurde und deshalb chromatographisch abgetrennt werden musste. Diese Trennung gelang nicht durch eine Modifikation der Steilheit des Methanol-Gradienten, weshalb Acetonitril als Fließmittel mit anderen Eigenschaften getestet wurde.

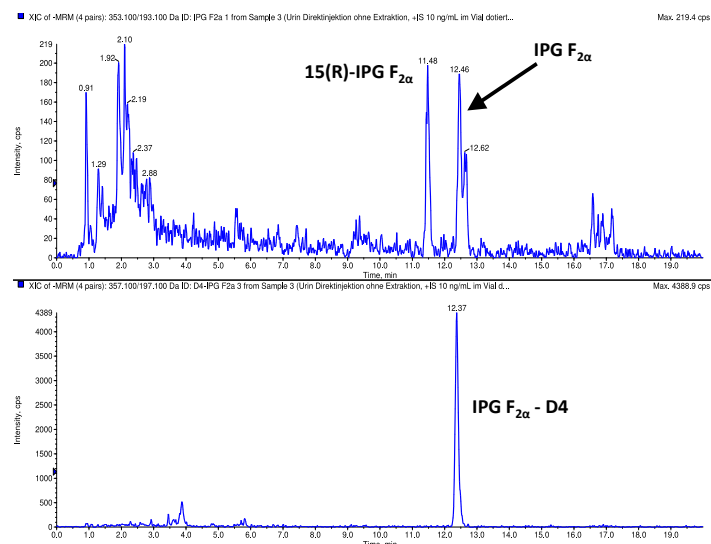


Abb. 6.34.: Chromatogramm der Direktinjektion eines Realurins mit Methanol als Fließmittel (oben: Zielanalyt, unten: interner Standard). Es ist eine deutliche Trennung zwischen den beiden Isomeren IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} erkennbar. Ein nicht identifiziertes Signal bei R_t = 12,62 min interferiert mit dem Zielanalyten IPG F_{2α}.

Die Trennung von IPG F_{2α} und co-eluierendem Signal gelang durch die Umstellung des organischen Fließmittelanteils von Methanol auf Acetonitril sofort (s. Abb. 6.35). Die damit einhergehende Annäherung zwischen dem IPG F_{2α}-Signal und einem Vorpeak bei der Retentionszeit 11,48 Minuten (s. Abb. 6.34) bzw. 10,44 Minuten (s. Abb. 6.35) war insofern unkritisch, als dass eine vollständige Trennung (Basislinientrennung) zwischen beiden Signalen erhalten blieb. Erst in späteren Versuchen zeigte sich durch die Zuordnung der Retentionszeit im Vergleich zu den verfügbaren Standardsubstanzen, dass es sich bei dem Vorpeak um das Isomer 15(R)-IPG F_{2α} handelte, welches ohne Ausnahme in jedem Realurin gemessen werden konnte.

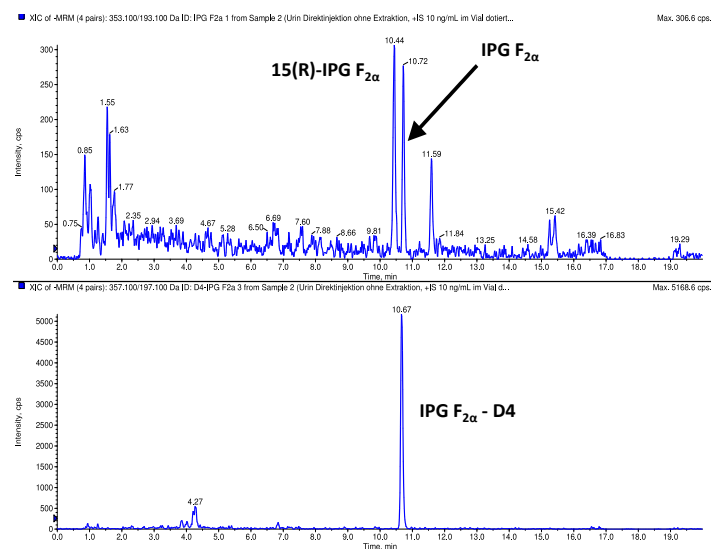


Abb. 6.35.: Chromatogramm der Direktinjektion eines Realurins mit Acetonitril als Fließmittel (oben: Zielanalyt, unten: interner Standard). Unter Beibehaltung der Basislinientrennung zwischen den Isomeren IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} konnte eine vollständige Abtrennung der Interferenz bei R_t = 11,59 min erreicht werden.

Die Abbildungen 6.34 und 6.35 auf der vorherigen Seite zeigen Chromatogramme, die aus jeweils einer Steigung des methanolischen bzw. acetonitrilischen Gradienten von 1 % pro Minute resultieren. Die Trennung konnte für Acetonitril als Fließmittel weiter verbessert werden, indem die Steigung auf 0,6 % pro Minute gesenkt wurde (s. Abb. 6.36).

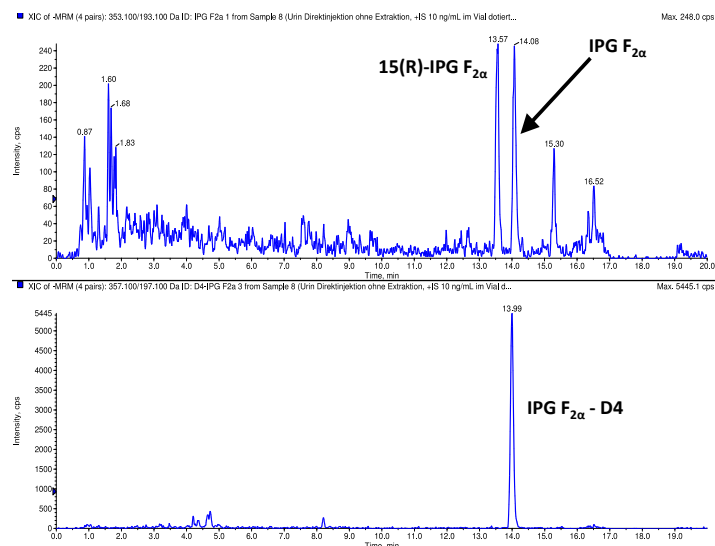


Abb. 6.36.: Chromatogramm der Direktinjektion eines Realurins mit Acetonitril als Fließmittel (oben: Zielanalyt, unten: interner Standard). Die Steigung des Gradienten wurde von vormals 1 % pro Minute auf 0,6 % pro Minute verringert. Dieses resultiert in einer Verbesserung der Trennung der beiden Isomere IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α}.

Die Parameter der resultierenden Methode finden sich unter Methode 4 (s. Tab. A.5 auf Seite 168), die vorgenommenen Veränderungen haben sich nicht nachteilig auf die Einstellungen des Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Moduls SelexION ausgewirkt. Die Parameter des SelexIONs wurden dennoch innerhalb der Validierung des Verfahrens als wesentlicher Selektivitätsfaktor erneut geprüft. Die Umgehung einer klassischen Extraktion bot Vorteile: Die komplette Probenvorbereitung wurde durch wenige Aufarbeitungsschritte weniger anfällig für Fehler oder Analytverluste, dabei auch deutlich schneller, einfacher und preiswerter.

6.9.1. Injektionsvolumen

In der Literatur wurde von deutlichen Veränderungen der Peakform berichtet, wenn das Injektionsvolumen zu hoch gewählt war [192]. Es wurde geprüft, welches Volumen sich unter den gewählten Bedingungen maximal injizieren ließ und wie groß die Auswirkung einer möglichen Volumenüberladung der chromatographischen Säule auf die Form und Breite der Peaks war. Das Volumen der verwendeten Injektionsschleife betrug 50 µL.

Tab. 6.12.: Auswirkung des Injektionsvolumens auf die Peakbreite

Volumen [μL]	Peakbreite [min]		
	auf 50 % Höhe	auf 10 % Höhe	auf 5 % Höhe
1	0,12	0,23	0,26
5	0,12	0,23	0,26
10	0,12	0,23	0,26
20	0,12	0,23	0,26
50	0,12	0,23	0,27

Zur Bewertung wurden die durchschnittlichen Breiten auf 50 %, 10 % und 5 % der Höhe des Peaks bei unterschiedlichen Injektionsvolumina miteinander verglichen (s. Tab. 6.12). Hierbei waren keine relevanten Unterschiede erkennbar. Auch aus einer Überlagerung der Chromatogramme von unterschiedlichen Injektionsvolumina war keine Veränderung der Peakform ableitbar (s. Abb. 6.37).

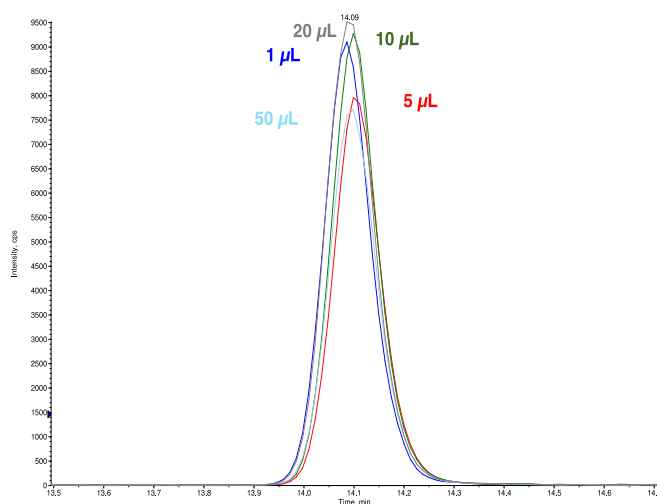


Abb. 6.37.: Darstellung des Vergleichs unterschiedlicher Injektionsvolumina; in der Überlagerung sind die verschiedenen Volumina farblich markiert. Es sind keine relevanten Abweichungen in der Form oder Breite der Peaks erkennbar.

Deshalb wurde in der finalen Methode 4 (s. Tab. A.5 auf Seite 168) mit einem Injektionsvolumen von 20 μL zur Analyse der Realproben weiter gearbeitet.

6.10. Validierung

Aus den vorangegangenen Experimenten ergab sich die finale Methode 4 mit chromatographischen Bedingungen und Detektoreinstellungen entsprechend Tabelle A.5 auf Seite 168. Die Probenvorbereitung bestand aus einer Verdünnung der Probe (bzw. des Kalibrators oder der Qualitätskontrolle) im Verhältnis 1 + 1 mit einer Lösung des internen Standards (2 ng/mL in 20 % (v/v) Acetonitril in Wasser). Die Methode wurde nach einer in der klinischen Chemie und forensischen Toxikologie allgemein akzeptierten Vorgehensweise validiert. Die dazu durchgeführten Experimente orientierten sich insbesondere an der Literatur von Krueve et al. [193, 194], wurden allerdings aufgrund der Verwendung eines Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Systems teilweise adaptiert oder erweitert. Zudem bestand das grundsätzliche Problem, dass es für eine endogene Substanz wie IPG F_{2α} bei ausreichender Sensitivität der Messmethode prinzipiell keine Leermatrix geben konnte. Aus diesem Grund wurden einige der üblichen Validierungsversuche in abgewandelter Form durchgeführt. Potentiell war die Verwendung eines synthetischen Urins (Surine) zu Teilen der Validierung möglich. Da dieser aber nur den anorganischen Teil der Matrix simuliert, würden dadurch die Fähigkeiten und Grenzen der Methode möglicherweise zu positiv eingeschätzt. Im Falle einer ausreichend guten Korrelation zu Realmatrix konnte Surine allerdings zur Kalibration verwendet werden. Der synthetische Urin wies keinen Grundgehalt an IPG F_{2α} auf und eine rechnerische Korrektur wäre bei einer Verwendung als Kalibratormatrix daher nicht nötig.

Die Ergebnisse von Mehrfachmessungen wurden so weit möglich im Format Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben. Die quantitative Auswertung erfolgte, sofern nicht anders angegeben, über die Peakflächenverhältnisse vom Analyt zum internen Standard (interne Quantifizierung).

6.10.1. Stabilität der Proben

Für die Stabilitätsuntersuchungen wurde Urin Nr. 17 verwendet (s. Tab. 5.23 auf Seite 51). Über eine Standardaddition wurde für diesen Urin ein IPG F_{2α}-Wert von 154 pg/mL berechnet. Für die folgenden Stabilitätsversuche ergaben sich daraus Dotierungsniveaus von 154 pg/mL (niedrig) bzw. 2154 pg/mL (hoch) IPG F_{2α}.

Stabilität der Proben im Autosampler

Die Stabilität der aufgearbeiteten Urinproben im Autosampler wurde über einen Zeitraum von bis zu zwei Tagen getestet. Das zum Zeitpunkt Null ermittelte Flächenverhältnis von IPG F_{2α} zum internen Standard wurde als 100 %-Wert definiert (s. Abb. 6.38).

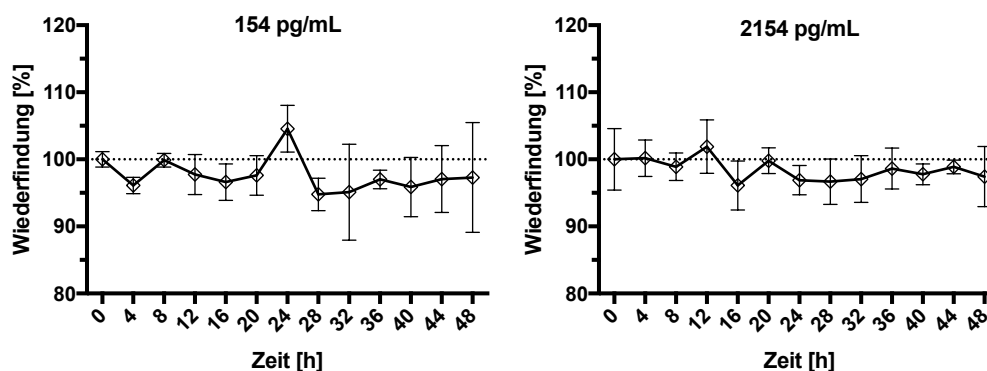


Abb. 6.38.: Darstellung der Stabilität von IPG F_{2α}-haltigen aufgearbeiteten Urinproben bei 10 °C im Autosampler. Die aufgearbeiteten Messlösungen waren auf beiden geprüften Konzentrationen über mindestens 48 Stunden stabil.

Der Zielanalyt IPG $F_{2\alpha}$ war unter den getesteten Bedingungen über mindestens 48 Stunden im Autosampler bei 10 °C stabil. Die mittlere Abweichung lag für beide Konzentrationen (154 pg/mL und 2154 pg/mL) unterhalb von 5 % des Ausgangswertes und innerhalb der getesteten Zeitspanne war kein Trend erkennbar (s. Abb. 6.38 auf der vorherigen Seite). Auch bei einer Auswertung ohne Verwendung des internen Standards (externe Quantifizierung) waren keine Zersetzungen oder Adsorptionseffekte an die Glaswände der Vials erkennbar.

Einfrier-/Auftau-Stabilität

Die Stabilität von IPG $F_{2\alpha}$ gegenüber Einfrieren und Auftauen wurde über drei Zyklen geprüft. Das Flächenverhältnis von IPG $F_{2\alpha}$ zum internen Standard einer frisch hergestellten Vergleichsprobe ohne Einfrier-/Auftau-Zyklen wurde als 100 %-Wert definiert (s. Abb. 6.39).

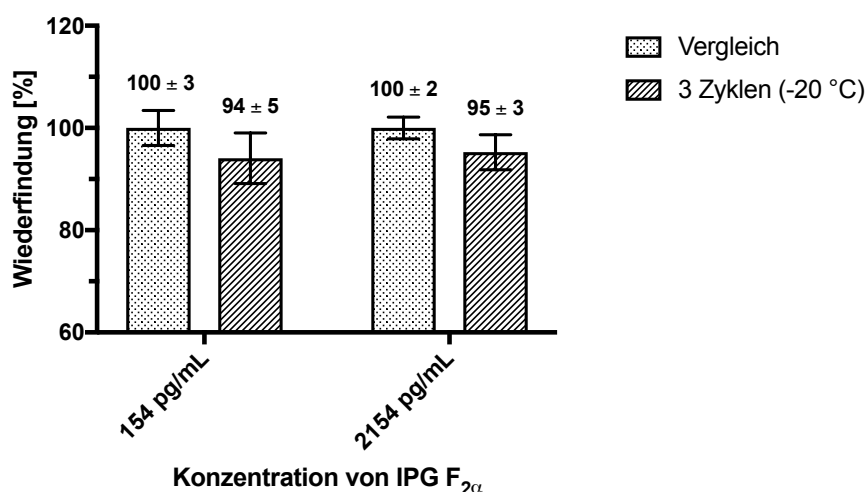


Abb. 6.39.: Darstellung der Einfrier-/Auftau-Stabilität von IPG $F_{2\alpha}$ -haltigen Urinen. Auch nach drei Einfrier-/Auftau-Zyklen konnte IPG $F_{2\alpha}$ in Urin als stabil angesehen werden.

Der Zielanalyt IPG $F_{2\alpha}$ war unter den getesteten Bedingungen gegenüber drei Einfrier-/Auftau-Zyklen stabil. Die mittlere Abweichung betrug maximal -6 % vom Vergleichswert (s. Abb. 6.39). Unter den verwendeten Bedingungen konnte IPG $F_{2\alpha}$ als stabil angesehen werden.

Laut der verfügbaren Literatur gelten Isoprostane als ausgesprochen stabile Markersubstanzen des oxidativen Stresses. Dieses gilt insbesondere für die Matrix Urin, da es dort aufgrund der fehlenden Arachidonsäure nicht zu einer artifiziellen Nachbildung während der Lagerung kommen kann. Für Urin werden Stabilitäten über eine Woche Inkubation bei 37 °C [3], mindestens sechs Monate Lagerung bei -20 °C [3] oder mehrere Jahre bei -80 °C [42] berichtet, Extrakte wurden mindestens eine Woche bei Raumtemperatur als stabil bewertet [151]. Die gemessenen Proben wurden bei -80 °C gelagert, vor der Messung kurzzeitig auch bei -20 °C, es wird daher von einer ausreichenden Stabilität ausgegangen.

6.10.2. Selektivität

Die Grundlage der Selektivität der verwendeten Methode war die chromatographische Trennung, siehe hierzu die Zusammenfassung der Retentionsdaten in Tabelle 6.13 auf der nächsten Seite.

Tab. 6.13.: Zusammenfassung der Retentionsdaten (Dilute & Shoot)

Substanz	Synonym	Retention [min]	rel. Retention zu IPG F _{2α} -D4	w _{1/2} [min]	Auflösung R _s
8-iso-15(R)-Prostaglandin F _{2α}	15(R)-IPG F _{2α}	13,58	0,97	0,12	2,50
Prostaglandin F _{2β}	PG F _{2β}	13,71	0,98	0,12	1,86
8-Isoprostaglandin F _{2α}	IPG F _{2α}	14,09	1,01	0,12	-
8-Isoprostaglandin F _{2β}	IPG F _{2β}	14,31	1,02	0,12	1,08
5-trans-Prostaglandin F _{2β}	5-trans-PG F _{2β}	14,47	1,03	0,12	1,86
11β-Prostaglandin F _{2α}	11β-PG F _{2α}	14,67	1,05	0,12	2,84
5-trans-Prostaglandin F _{2α}	5-trans-PG F _{2α}	16,22	1,16	0,08	12,53
15(R)-Prostaglandin F _{2α}	15(R)-PG F _{2α}	16,24	1,16	0,07	13,31
ent-Prostaglandin F _{2α}	ent-PG F _{2α}	16,30	1,16	0,07	13,68
Prostaglandin F _{2α}	PG F _{2α}	16,30	1,16	0,07	13,68

Auflösung $R_s = \frac{(t_2 - t_1)}{0,85 * (w_{1/2}(1) + w_{1/2}(2))}$ ([195], modifiziert) bezogen auf das Signal von IPG F_{2α}

wobei t = Retentionszeit (von Peak 1 bzw. 2) und w_{1/2} = Peakbreite auf halber Höhe (von Peak 1 bzw. 2)

Die Berechnung der Auflösung R_s bezogen auf IPG F_{2α} zeigte eine ausreichende Trennung der Peaks an (Basislinientrennung bei R_s ≥ 1,5). Eine Ausnahme bildete IPG F_{2β}. Hier wurde unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen keine vollständige Trennung zu IPG F_{2α} erreicht (R_s = 1,08). Die Trennung beider Substanzpeaks war dabei eindeutig und ausreichend, um als separate Signale gut erkannt und falls vorliegend entsprechend integriert werden zu können. Eine Verschiebung der Signale, wie unter alkalischen Bedingungen beschrieben, konnte nicht beobachtet werden. Die Retention war unter den finalen Bedingungen stabil.

Ein DMS-Mapping ermöglichte einen Vergleich verschiedener Kompensationsspannungen (COV, hier 8-9 V in 0,25 V-Inkrementen) ohne Schwankungen bedingt durch unterschiedliche Injektionen oder durch die Detektion berücksichtigen zu müssen, da die Messungen parallel aus derselben Injektion erfolgten (s. Abb. 6.40).

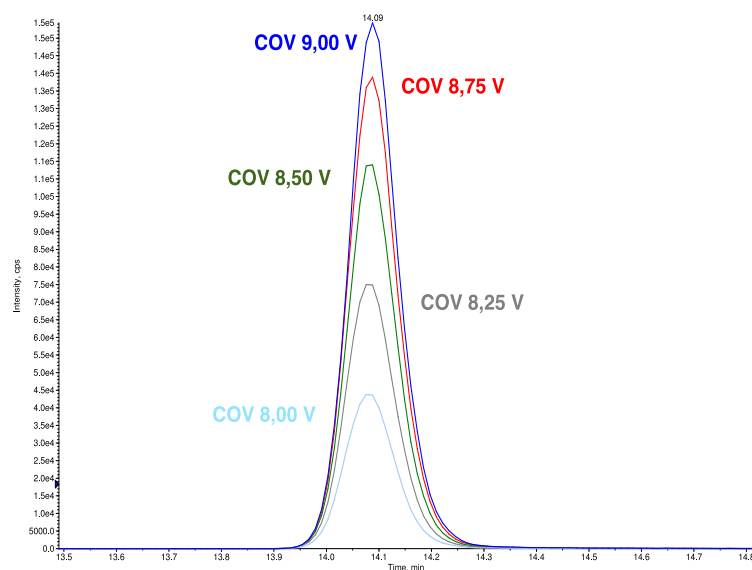


Abb. 6.40.: Darstellung der Auswirkung von unterschiedlichen Kompensationsspannungen (COV) auf die Signalintensität von IPG F_{2α}. Ausgehend von der optimalen Einstellung von 9 V sinkt die Signalintensität mit Veränderung des COV-Wertes.

Im DMS-Mapping wurden alle verfügbaren Isomere einzeln mit COV-Einstellungen ausgehend vom Optimum für IPG F_{2α} (9 V) gemessen und die COV-Werte dabei in 0,25 V-Inkrementen bis 8 V gesenkt. Zum Vergleich wurden entsprechende Injektionen ohne Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS) durchgeführt und dazu das SelexION-Modul deaktiviert. In den folgenden Abbildungen wurden die Analyte dargestellt, welche durch eine potentielle Überschneidung der Kompensationsspannungen mit dem Zielanalyten eine chromatographische Trennung erforderten (vergleiche hierzu Tab. 6.3 auf Seite 65). Die angegebene prozentuale Transmission bezieht sich auf die Werte der jeweiligen Substanz bei ausgeschalteter DMS-Zelle als 100 %-Vergleichswert. Bei Verwendung des DMS-Moduls stiegen die Signalfächen an. Dieses lag an einem Fokussierungseffekt durch das SelexION. Eine Transmissionsrate von < 5% wurde als selektiv angesehen.

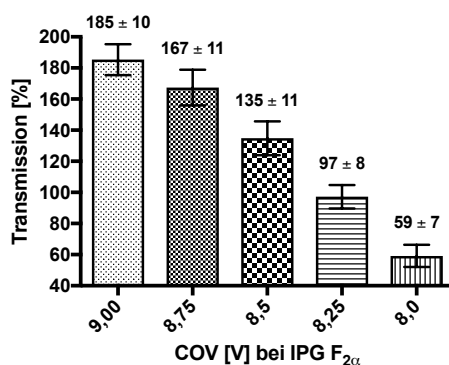


Abb. 6.41.: Darstellung der relativen Transmission von IPG F_{2α} in Abhängigkeit von der Kompensationsspannung (COV); die relative Transmission durch das SelexION bezieht sich auf den Wert dieser Substanz bei ausgeschaltetem DMS-Modul. Ausgehend vom Optimum der Kompensationsspannung von IPG F_{2α} (9 V) verringert sich das Signal mit sinkendem COV-Wert.

Eine Absenkung der Einstellung der Kompensationsspannung (COV) des Zielanalyten IPG F_{2α} ausgehend von dessen Optimalwert von 9,0 V schrittweise auf 8,0 V verringerte die Transmission der Ionen durch die DMS-Zelle.

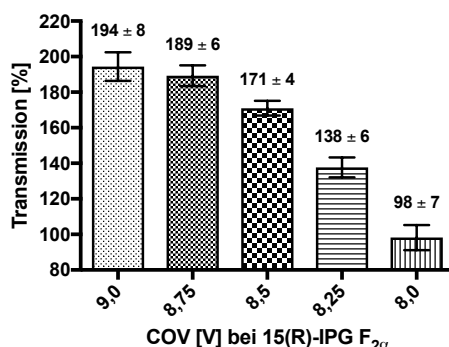


Abb. 6.42.: Darstellung der relativen Transmission von 15(R)-IPG F_{2α} in Abhängigkeit von der Kompensationsspannung (COV); die relative Transmission durch das SelexION bezieht sich auf den Wert dieser Substanz bei ausgeschaltetem DMS-Modul. Ausgehend vom Optimum der Kompensationsspannung von IPG F_{2α} (9 V) verringert sich das Signal mit sinkendem COV-Wert.

Das Optimum der Kompensationsspannung (COV) von 15(R)-IPG F_{2α} lag etwas niedriger als bei IPG F_{2α} (s. Tab. 6.3 auf Seite 65). Die Transmission blieb bei sinkender Kompensationsspannung daher zunächst relativ stabil und verringerte sich erst bei deutlicher Abweichung vom Optimalwert des Zielanalyten (z. B. 8,25 V statt 9,0 V). Die Differenz der COV-Optima von IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} war nicht ausreichend, um eine Selektivität mit Hilfe des DMS-Moduls zu erzeugen. Daher war eine chromatographische Trennung dieser beiden Isomere erforderlich.

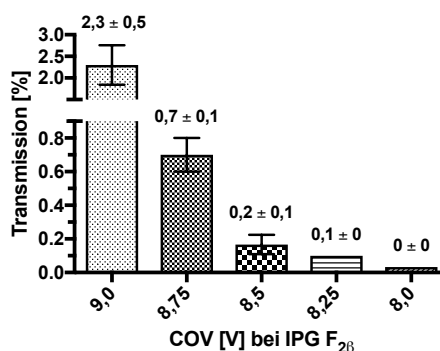


Abb. 6.43.: Darstellung der relativen Transmission von IPG F_{2β} in Abhängigkeit von der Kompensationsspannung (COV); die relative Transmission durch das SelexION bezieht sich auf den Wert dieser Substanz bei ausgeschaltetem DMS-Modul. Bereits im Optimum der Kompensationsspannung von IPG F_{2α} (9 V) liegt die Transmission von IPG F_{2β} unter dem Selektivitätskriterium von < 5% und verringert sich mit sinkendem COV-Wert weiter.

Das Isomer IPG F_{2β} zeigte im COV-Optimum des Zielanalyten (9,0 V) bereits eine nur geringe DMS-Transmission von 2,3 % und erfüllte damit das Selektivitätskriterium von < 5 % Transmissionsrate.

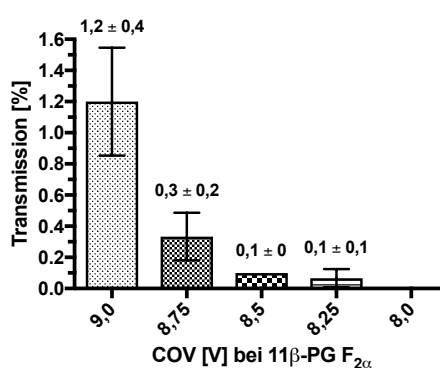


Abb. 6.44.: Darstellung der relativen Transmission von 11β-PG F_{2α} in Abhängigkeit von der Kompensationsspannung (COV); die relative Transmission durch das SelexION bezieht sich auf den Wert dieser Substanz bei ausgeschaltetem DMS-Modul. Bereits im Optimum der Kompensationsspannung von IPG F_{2α} (9 V) liegt die Transmission von 11β-PG F_{2α} unter dem Selektivitätskriterium von < 5 % und verringert sich mit sinkendem COV-Wert weiter.

Auch 11 β -PG F_{2 α} erfüllte mit einer Transmission von 1,2 % im COV-Optimum von IPG F_{2 α} (9,0 V) bereits das Selektivitätskriterium von < 5 % Transmissionsrate. Die Ergebnisse des DMS-Mappings wurden in Tabelle 6.14 zusammengefasst. Alle in der Tabelle nicht genannten Isomere wurden durch das SelexION vollständig selektiert. Unter den gewählten Einstellungen ergaben die Messungen dieser Substanzen keine Signale.

Tab. 6.14.: Ergebnisse der Validierung der Transmission durch das DMS-Modul

COV [V]	Transmission [%]							
	IPG F _{2α}		15(R)-IPG F _{2α}		IPG F _{2β}		11 β -PG F _{2α}	
	relativ*	Δ^{**}	relativ*	Δ^{**}	relativ*	Δ^{**}	relativ*	Δ^{**}
9,0	185,4		194,4		2,3		1,2	
8,75	167,4	-9,7	189,2	-2,6	0,7	-70,1	0,3	-71,9
8,5	134,8	-27,3	171,0	-12,0	0,2	-91,3	0,1	-89,6
8,25	97,2	-47,6	137,7	-29,1	0,1	-96,7	0,1	-94,9
8,0	59,2	-68,1	98,2	-49,5	0,0	-98,4	0,0	-97,0

* bezogen auf die Werte der jeweiligen Substanz bei ausgeschalteter DMS-Zelle

** prozentual bezogen jeweils auf den Wert von COV 9,0 V als 100%-Wert

Bezogen auf die o. g. Kriterien lag für die Isomere IPG F_{2 β} und 11 β -PG F_{2 α} eine Selektivität (< 5 % Transmissionsrate) bei einer COV-Einstellung von 9,0 V vor. Mit der Ausnahme von 15(R)-IPG F_{2 α} konnte das SelexION erfolgreich zur Trennung aller übrigen verfügbaren Isomere von IPG F_{2 α} eingesetzt werden.

Selektivität in Realmatrix

Um mögliche Störungen durch Bestandteile aus der Urinmatrix zu erkennen, wurden 20 verschiedene Urine in unterschiedlichen Verdünnungen (unverdünnt, 1 + 1 und 1 + 4 mit 20 % (v/v) Acetonitril in Wasser verdünnt) analysiert. Hierbei diente die Creatinin-Konzentration als Maß der Urinkonzentration (s. Tab. 5.23 auf Seite 51).

Beispielhaft werden dazu drei typische Chromatogramme gezeigt: Urin Nr. 2 (niedriger Creatininhalt mit 137 mg/L) in Abbildung 6.45 auf der nächsten Seite, Urin Nr. 16 (Raucher, mittlerer Creatininhalt mit 742 mg/L) in Abbildung 6.46 auf der nächsten Seite und Urin Nr. 20 (hoher Creatininhalt mit 2689 mg/L) in Abbildung 6.47 auf Seite 102.

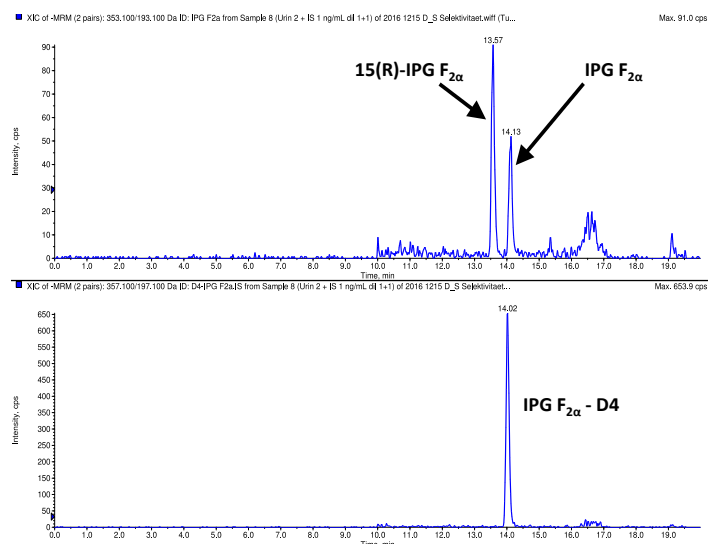


Abb. 6.45.: Darstellung der Selektivität am Beispiel von Urin Nr. 2 (Creatinin 137 mg/L) nach Verdünnung im Verhältnis 1 + 1 mit 20 % (v/v) Acetonitril in Wasser (oben: Zielanalyt, unten: interner Standard). Außer den beiden Isomeren IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} sind keine weiteren Signale oder Störungen erkennbar.

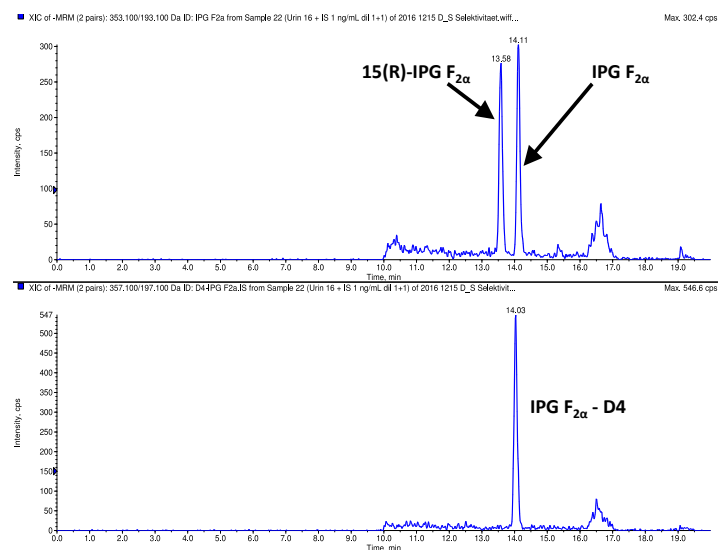


Abb. 6.46.: Darstellung der Selektivität am Beispiel von Urin Nr. 16 (Creatinin 742 mg/L, Raucher) nach Verdünnung im Verhältnis 1 + 1 mit 20 % (v/v) Acetonitril in Wasser (oben: Zielanalyt, unten: interner Standard). Außer den beiden Isomeren IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} sind keine weiteren Signale oder Störungen erkennbar.

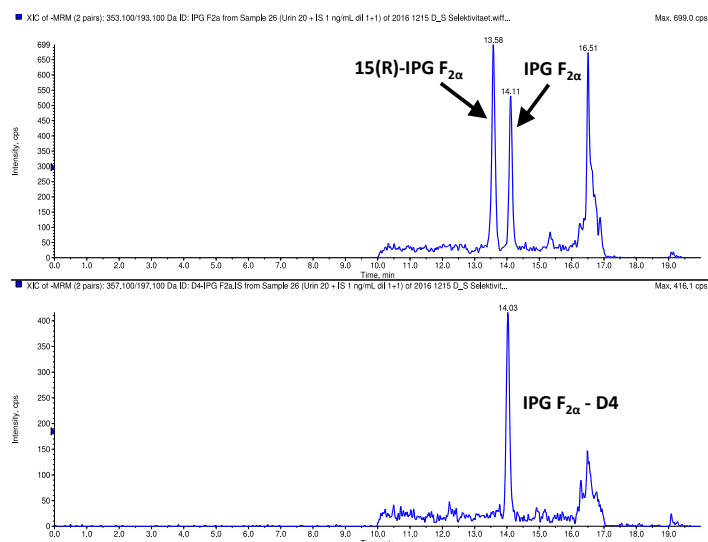


Abb. 6.47.: Darstellung der Selektivität am Beispiel von Urin Nr. 20 (Creatinin 2689 mg/L) nach Verdünnung 1 + 1 mit 20 % (v/v) Acetonitril in Wasser (oben: Zielanalyt, unten: interner Standard). Außer den beiden Isomeren IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} sind keine weiteren Signale oder Störungen im Retentionsbereich des Zielanalyten IPG F_{2α} erkennbar.

Alle 20 Urine zeigten in jeder Verdünnungsstufe vom Untergrund und Begleitsignalen klar getrennte Signale des endogenen Zielanalyten IPG F_{2α}. In keiner Probe war - unabhängig von der Verdünnungsstufe - eine Deformation oder Störung der Peakform des IPG F_{2α}-Signals erkennbar. In jedem Urin war hingegen ein Signal von 15(R)-IPG F_{2α} messbar. Offenbar lag auch dieses Isomer in jeder Probe vor, wobei es jedoch vom Zielanalyten deutlich abgetrennt war und nicht interferierte.

6.10.3. Linearität

Die Linearität einer LC-MS/MS-Methode wird durch diverse Faktoren beeinflusst, u. a. durch die Ionenquelle (vom technischen Design und den Einstellungen abhängig, sowie auch von Matrixeinflüssen), den Ionentransport in den Massenanalysator, das technische Design des Massenanalysators und den Detektor selbst [194]. Geprüft wurde die Linearität in Matrix bis zu 10 ng/mL IPG F_{2α}, höhere Messwerte wurden nicht erwartet. In einem solchen Fall müsste die Probe entsprechend verdünnt und erneut gemessen werden. Da keine Real-Leermatrix zur Verfügung stand, wurde die Linearität in Urin Nr. 2 und als Vergleich dazu in Surine geprüft (s. Tab. 5.23 auf Seite 51). Auf einen Vergleich der Linearität über die Steigung der resultierenden Regressionsgerade hat ein vorhandener endogener IPG F_{2α}-Grundgehalt des Urins Nr. 2 keinen Einfluss.

Gemäß Krue et al. [194] wurde zunächst eine optische Bewertung der Regressionsgeraden durchgeführt. Sowohl in Surine (s. Abb. 6.48 auf der nächsten Seite) wie auch in Urin (s. Abb. 6.49 auf der nächsten Seite) war visuell bis 10 ng/mL IPG F_{2α} eine Linearität gegeben, die Residuen zeigten dabei jeweils eine zufällige Verteilung.

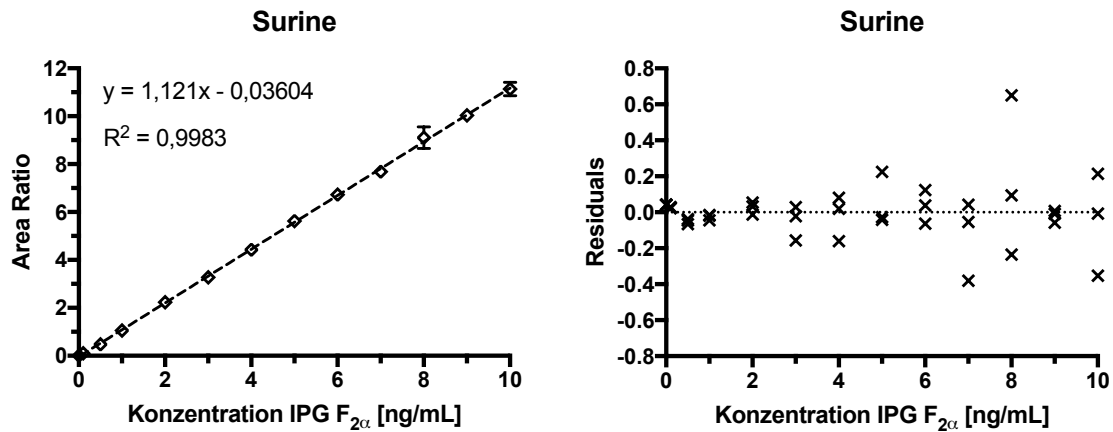


Abb. 6.48.: Darstellung der Linearität von IPG F_{2α} in Surine (links) und den zugehörigen Residuen (rechts). Es war eine Linearität bis 10 ng/mL IPG F_{2α} gegeben, die Residuen zeigten eine zufällige Verteilung und variierten mit zunehmender Konzentration stärker (Heteroskedastizität).

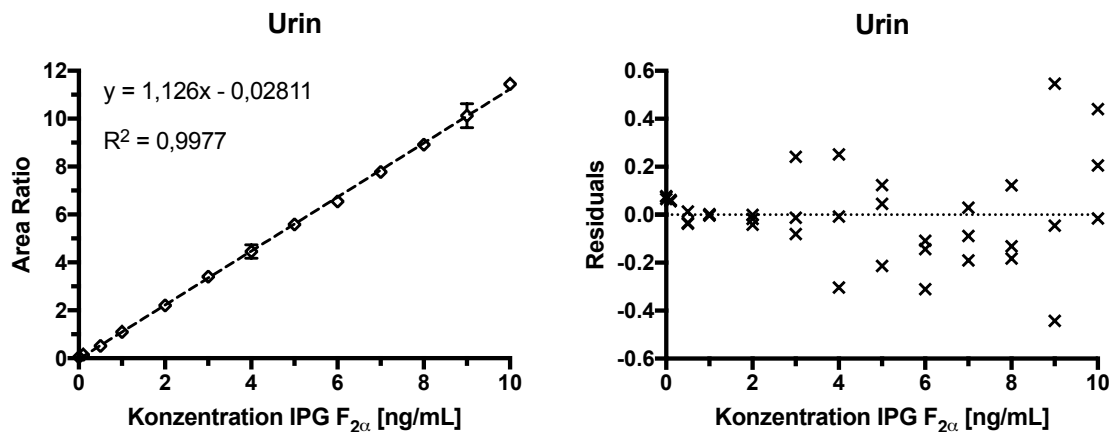


Abb. 6.49.: Darstellung der Linearität von IPG F_{2α} in Urin (links) und den zugehörigen Residuen (rechts). Es war eine Linearität bis 10 ng/mL IPG F_{2α} gegeben, die Residuen zeigten eine zufällige Verteilung und variierten mit zunehmender Konzentration stärker (Heteroskedastizität).

Die statistische Prüfung auf Homoskedastizität (gleichmäßige Standardabweichung der Signale über den Messbereich) wurde per F-Test ($p = 0,05$) durchgeführt [194]. In beiden geprüften Matrices (Surine bzw. Urin) lag eine heteroskedastische Verteilung vor. Da die Residuen mit zunehmender Konzentration stärker variierten (Heteroskedastizität), wurde eine Wichtung ($1/x^2$) zur Auswertung der Proben verwendet, dadurch ergab sich eine bessere Anpassung der Kalibratoren insbesondere im niedrigen Messbereich. Weiterhin wurde ein Lack-of-Fit Test durchgeführt, ein Verfahren basierend auf einer Analyse der Residualvarianzen [194]. In beiden Matrices wurde gemäß des durchgeführten Lack-of-Fit Tests ($p = 0,05$) eine Linearität bestätigt.

Vergleich der Kalibrationen in Surine und Urin

Im Falle einer guten Übereinstimmung konnte ein synthetischer Urin (Surine) anstelle eines Realurins zur Kalibration verwendet werden. Als synthetische Matrix wies Surine keinen endogenen Grundgehalt an IPG $F_{2\alpha}$ auf, der über eine Standardaddition bestimmt und dann rechnerisch in einer Kalibration korrigiert werden musste. Der Kunsturin Surine wurde auf seine Eignung geprüft, indem ein Vergleich zwischen Kalibrationsreihen in Surine und Urin durchgeführt wurde.

Dabei wurde zunächst mittels eines F-Tests ($p = 0,05$) gezeigt, dass die Varianzen beider Kalibrationen vergleichbar waren. Anschließend wurde durch einen t-Test ($p = 0,05$) eine Vergleichbarkeit der Steigungen festgestellt. Eine Auswertung mittels der Statistiksoftware Graphpad PRISM ergab ebenfalls, dass die Unterschiede der Steigungen beider Kalibrationsreihen nicht signifikant waren ($p = 0,05$). Da eine Vergleichbarkeit der Kalibrationsreihen in beiden Matrices gegeben war, bestand für weitere Versuche keine Notwendigkeit für Standardadditionen. Die Bestimmung der IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen von Urinen konnte über eine Kalibration in Surine erfolgen.

Vergleich zwischen mehreren Matrices

Anhand von Kalibrationen in Surine wurden zunächst die IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen der verglichenen Urine als Mittelwert ($n = 6$) bestimmt (s. Tab. 6.15).

Tab. 6.15.: endogene IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen der für den Matrixvergleich verwendeten Urine

Matrix	IPG $F_{2\alpha}$ [pg/mL]
Urin 2	39,6
Urin 10	262,1
Mixurin	595,5

Mit Hilfe dieser endogenen Niveaus wurden nun die IPG $F_{2\alpha}$ -Werte der durch Verdünnung oder Aufdotierung hergestellten Kalibratoren berechnet (s. Tab. 6.16).

Tab. 6.16.: Konzentrationen der für den Matrixvergleich verwendeten Kalibratoren

Kalibrator	Surine	IPG $F_{2\alpha}$ [pg/mL]		
		Urin 2	Urin 10	Mixurin
L1	25	19,8	26,2	29,8
L2	100	99,6	131,1	119,1
L3	500	539,6	512,1	595,5
L4	1000	1039,6	1262,1	1595,5
L5	2000	2039,6	2262,1	2595,5
L6	3000	3039,6	3262,1	3595,5
L7	4000	4039,6	4262,1	4595,5
L8	5000	5039,6	5262,1	5595,5

Die so ermittelten Soll-Werte wurden als Berechnungsgrundlage einer sechsfach-Messung der jeweiligen Kalibrationen verwendet. Die resultierenden Steigungen der sechs einzelnen Kalibrationsreihen (s. Tab. 6.17 auf der nächsten Seite) wurden mit Hilfe der Statistiksoftware Graphpad PRISM per einfaktoriellem ANOVA-Test (gepaart, Mehrfachvergleich nach Tukey, $p = 0,05$) ausgewertet.

Tab. 6.17.: Vergleich der Steigungen der Regressionsgeraden in mehreren Matrices

Kalibration	Steigung der Regression von IPG $F_{2\alpha}$ (Wichtung $1/x^2$)			
	Surine	Urin 2	Urin 10	Mixurin
1	0,000821336	0,000859648	0,000840195	0,000839418
2	0,000858596	0,000863088	0,000835843	0,000856316
3	0,000836711	0,000847876	0,000855102	0,000877249
4	0,000823527	0,000843296	0,000850196	0,000874054
5	0,000844675	0,000877002	0,000897683	0,000883359
6	0,000848582	0,000843647	0,000857361	0,000899349
Mittelwert	0,000838905	0,000855760	0,000856063	0,000871624
Abweichung [%]*	-	2,0	2,0	3,9

* bezogen auf Surine

Gemäß des ANOVA-Mehrfachvergleichs (s. Abb. 6.50) unterschieden sich mit Ausnahme des Matrixpaares Surine-Mixurin alle anderen Kombinationen nicht statistisch signifikant voneinander. Die mittlere Abweichung der Steigung des Mixurins zu Surine betrug +3,9 %, die Differenzen der anderen Urine fielen mit jeweils +2,0 % geringer aus.

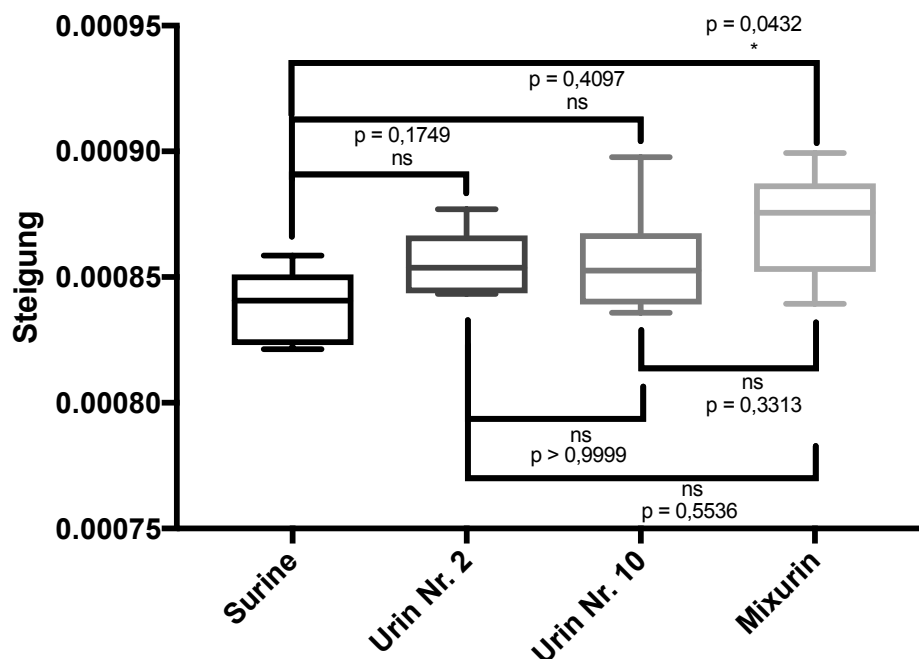


Abb. 6.50.: Darstellung des Vergleichs der Steigungen der Regressionsgeraden in mehreren Matrices mittels ANOVA ($p = 0,05$). Mit Ausnahme des Matrixpaares Surine-Mixurin unterscheiden sich alle anderen Kombinationen nicht signifikant voneinander.

Der verwendete Mixurin wurde mit seinem unphysiologisch hohen Creatiningehalt (4302 mg/L) bewusst als extremes Beispiel verwendet. Die zwar statistisch signifikante aber mit +3,9 % geringe mittlere Abweichung war für die praktische Anwendung nicht relevant. Es sollte ein Vorher-Nachher-Vergleich von Urinproben desselben Individuums durchgeführt werden. Ein potentieller Unterschied

würde trotz leichter Abweichung einer in Surine angesetzten Kalibration zu einem extrem konzentrierten Urin erkennbar und reproduzierbar messbar sein, sofern die Präzision des Verfahrens und der Unterschied in den Proben ausreichend war, um diesen als Differenz zu erkennen.

6.10.4. Präzision und Richtigkeit

Präzision und Richtigkeit werden üblicherweise in einer Versuchsreihe gemeinsam überprüft. Werden beide Parameter getrennt voneinander bestimmt, so muss zuerst die Präzision gemessen werden, da diese die Bestimmung der Richtigkeit beeinflusst (aber nicht umgekehrt) [194].

Präzision

Die Präzision eines Messverfahrens ist ein Teil der Messunsicherheit, denn es gibt einen Zusammenhang mit dem zufälligen Fehler. Sie beschreibt das Ausmaß der Übereinstimmung zwischen den in Wiederholungsmessungen an derselben Probe unter definierten Bedingungen gemessenen Werten [194]. Die Präzision zeigt somit die Streuung des Verfahrens an, entweder innerhalb einer kurzen Zeitspanne wie einem Tag oder auch über einen längeren Zeitraum hinweg. Präzision ist unabhängig von einem Referenzwert der Probe und sollte auf unterschiedlichen Konzentrationsniveaus bestimmt werden, da es deutliche Hinweise auf eine Konzentrationsabhängigkeit der Wiederholpräzision bei LC-Methoden gibt [194].

Die Wiederholpräzision (repeatability) und die Laborpräzision (intermediate precision) wurden auf insgesamt drei unterschiedlichen Niveaus (niedrig, mittel und hoch) an acht unterschiedlichen Messtagen über etwa einen Monat hinweg geprüft. Die Angabe der Präzision (s. Tab. 6.18) erfolgt als Unpräzision in Form von absoluten Standardabweichungen (s) bzw. des Variationskoeffizienten (VK).

Tab. 6.18.: Zusammenfassung der Validierungsdaten zu Präzision und Richtigkeit

	Wiederholpräzision		Laborpräzision		Richtigkeit
	s [pg/mL]	VK [%]	s [pg/mL]	VK [%]	[%]
L1 (niedrig)					
40 pg/mL	3,3	7,5	6,0	13,2	
Basallevel Urin Nr. 2					
L2 (mittel)					
240 pg/mL	11,8	4,9	13,5	5,6	-1,9
Urin Nr. 2 + 200 pg/mL					(-5,0 bis 2,7)
L3 (mittel)					
270 pg/mL	10,8	4,0	12,0	4,4	
Basallevel Urin Nr. 10					
L4 (hoch)					
2270 pg/mL	57,7	2,5	91,8	3,9	+4,2
Urin Nr. 10 + 2000 pg/mL					(-0,9 bis 9,4)

An jedem Messtag wurde die jeweils tagesaktuelle Kalibration zur Berechnung der Werte verwendet. Die Auswertung erfolgte über die Flächenverhältnisse zum internen Standard mit einer Wichtung $1/x^2$, was eine bessere Anpassung der Kalibratoren insbesondere im niedrigen Messbereich ergab. Die Wiederholpräzision wurde als Durchschnittswert der individuellen Standardabweichung von jedem *einzelnen Messtag* berechnet und als absoluter Wert oder als Variationskoeffizient dargestellt.

Auf dem niedrigsten Messniveau lag der Variationskoeffizient unterhalb von 10 %, auf mittlerem Niveau bei unter 5 % und bei hohen Messwerten bei 2,5 % (s. Tab. 6.18 auf der vorherigen Seite).

Die Laborpräzision ergab sich aus der durchschnittlichen Standardabweichung des Vergleichs von Messungen an *unterschiedlichen Tagen*, wobei die jeweils gleichen Messungen eines Levels (1. Messung oder 2. bis 6. Messung etc.) der verschiedenen Tage miteinander verglichen und ein Durchschnitt der Ergebnisse verwendet wurde. Die Unpräzision blieb unter 15 % auf dem niedrigen Niveau, für die mittleren und hohen Messbereiche sanken die Variationskoeffizient-Werte auf etwa 5 % und schließlich bis unter 4 % (s. Tab. 6.18 auf der vorherigen Seite).

Spezielle Akzeptanzkriterien für die Präzision einer Methode finden sich beispielsweise in den Validierungsvorgaben der U. S. Food and Drug Administration (FDA) [196] und der European Medicines Agency (EMA) [197]. Die zulässige Abweichung der Präzision beträgt hier jeweils ≤ 15 % VK bzw. ≤ 20 % VK in der Nähe der Bestimmungsgrenze. Die Vorgaben der Generaldirektion Gesundheit und Lebensmittelsicherheit der EU (SANTE) bzw. EU-Direktive 2002/657/EC erlauben eine Abweichung der Präzision von ≤ 20 % VK [194, 198]. Alle genannten Vorgaben wurden von der vorliegenden Methode erfüllt. Es sollte ein Vorher-Nachher-Vergleich mit Proben desselben Individuums durchgeführt werden, um zu prüfen, ob es dabei zu einem signifikanten Anstieg von Messwerten kam. Für diese Aufgabe wurde Präzision als wichtiger eingestuft im Vergleich zur Richtigkeit. Es sollten durch die Messergebnisse auch kleine Unterschiede in den Proben erkannt werden, was erst durch eine geringe Streuung möglich wurde.

Richtigkeit

Die Richtigkeit eines Messverfahrens bezieht sich auf die durchschnittliche Übereinstimmung der Messwerte zu einem Referenzwert, insofern gibt es einen Zusammenhang mit dem systematischen Fehler [194]. Es war kein kommerzielles Referenzmaterial verfügbar, somit wurde ersatzweise dotierte Realmatrix verwendet. Da es auch keine reale Leermatrix gab, wurde ein Realurin mit IPG F_{2α} zusätzlich aufdotiert und die Differenz zwischen dem endogenen IPG F_{2α}-Grundwert und der Aufstockung im Vergleich zur bekannten dotierten Menge als Maß für die Richtigkeit herangezogen.

Die Richtigkeit (trueness) des Verfahrens wurde auf zwei Konzentrationsniveaus gleichzeitig mit den für die Präzision beschriebenen Versuchen ausgewertet (s. Tab. 6.18 auf der vorherigen Seite). Dazu wurde an jedem Messtag die Differenz des Messwertes des jeweiligen dotierten Urins (L2 bzw. L4) zu dem gemessenen durchschnittlichen Basallevel (L1 bzw. L3) mit der Solldifferenz, also der aufgestockten Menge von 200 pg/mL bzw. 2000 pg/mL, in je sechs separaten Aufarbeitungen verglichen und prozentual angegeben. Im mittleren Konzentrationsbereich lag die Unrichtigkeit des Verfahrens bei durchschnittlich -1,9 % (bei einer Spanne von -5,0 % bis +2,7 %), auf dem hohen Konzentrationsniveau wurde eine Unrichtigkeit von +4,2 % (mit einer Spanne von -0,9 % bis +9,4 %) berechnet (s. Tab. 6.18 auf der vorherigen Seite). Spezielle Akzeptanzkriterien für die Richtigkeit einer Methode finden sich beispielsweise in den Validierungsvorgaben der U. S. Food and Drug Administration (FDA) [196] und der European Medicines Agency (EMA) [197]. Die zulässige Abweichung der Richtigkeit beträgt hier jeweils ≤ 15 % bzw. ≤ 20 % in der Nähe der Bestimmungsgrenze. Die vorliegende Methode erfüllt diese genannten Vorgaben.

6.10.5. Matrixeffekt

Matrixeffekte sind im engeren Sinn ein Teil der Richtigkeit [194], werden aber mittlerweile als so wesentlich für LC-MS-Methoden eingeschätzt, dass sie auch als separater Validierungspunkt betrachtet werden können. Die verwendete Aufarbeitung bestand aus einem einfachen Verdünnungsschritt mit einer Lösung des internen Standards. Da keine Extraktion verwendet wurde und auch keine Real-Leermatrix verfügbar war, konnte das zur Bestimmung der Matrixeffekte verbreitete Verfahren nach Matuszewski [199] nicht angewendet werden. Ein anderes übliches Verfahren ist die Aufzeichnung von Suppressionsprofilen, dieses hat allerdings vorwiegend qualitativen Charakter [194]. Alternativ

wurde ein quantitatives Verfahren nach der Beschreibung bei Krueve et al. gewählt [194], in dem ein Vergleich der Steigungen von Kalibrationen in Matrix gegen Lösungsmittel durchgeführt wurde. Die Auswertung des Matrixeffektes (s. Tab. 6.19) erfolgte zunächst nach der externen Methode und anschließend zusätzlich über die Verhältnisse zum internen Standard. Dieses sollte prüfen, ob durch eine Auswertung nach der internen Methode ein eventuell vorhandenen Matrixeffekt kompensiert werden konnte.

Tab. 6.19.: Zusammenfassung der Validierungsdaten zum Matrixeffekt

	Creatinin [mg/L]	externe Auswertung		interne Auswertung	
		Steigung	Matrixeffekt [%]	Steigung	Matrixeffekt [%]
Wasser	0	11,13317	0,0	0,00089	0,0
Surine	805	11,09587	-0,3	0,00086	-3,1
Urin Nr. 2	137	10,90755	-2,0	0,00090	1,2
Urin Nr. 10	1901	8,90971	-20,0	0,00089	-0,1
Mixurin	4302	6,35813	-42,9	0,00086	-3,4

Niedrig konzentrierte Matrices wie Surine oder Urin Nr. 2 (Creatinin 137 mg/L) zeigten keinen relevanten Matrixeffekt, der konzentrierte Urin Nr. 10 (Creatinin 1901 mg/L) hingegen eine Suppression von -20 % und der gemischte Extremurin (Creatinin 4302 mg/L) eine Signalsuppression bis -43 %. Die Matrixeffekte wurden durch die Verwendung eines internen Standards effektiv kompensiert (s. Tab. 6.19). Die gemessenen Suppressionseffekte waren für eine Ultraspurenanalytik aus komplexer Matrix mit nur einer geringen Verdünnung (1 + 1) und sonst keiner weiteren Aufreinigung als gut zu bewerten. Konzentrierte Urine ergaben zwar eine höhere Suppression, haben gleichzeitig aber auch in Relation betrachtet einen höheren Gehalt an IPG F_{2α}. Daher konnten konzentriertere Urine optional auch deutlich stärker verdünnt werden. Der Verdünnungseffekt wirkt sich stärker auf die supprimierenden Bestandteile der Matrix aus als auf den zu messenden Analyten. Eine Verdünnung von Proben war daher ein effektiver Weg um Matrixeffekte zu kompensieren, wenn die angedachte Aufarbeitung mit einer Verdünnung im Verhältnis 1 + 1 nicht ausreichen sollte.

6.10.6. Grenzwerte: Nachweisgrenze / Bestimmungsgrenze

Da es bezüglich IPG F_{2α} als endogene Substanz prinzipiell keine Real-Leermatrix geben kann, werden in der verfügbaren Literatur Bestimmungs- und Nachweisgrenzen oft in dotiertem Wasser, künstlicher Matrix, Lösungsmitteln oder einer Salzlösung festgelegt [100, 102, 103, 139, 189]. Diese Ansätze wurde bewußt abgelehnt und die Bestimmung der analytischen Grenzwerte so weit wie möglich in Realmatrix durchgeführt. Anhand von Kalibrationen in Surine wurden zunächst die endogenen IPG F_{2α}-Konzentrationen der verwendeten Urine als Mittelwert (n = 6) bestimmt (s. Tab. 6.20).

Tab. 6.20.: endogene IPG F_{2α}-Konzentrationen der für die Grenzwertbestimmung verwendeten Urine

Matrix	IPG F _{2α} [pg/mL]
Urin 2	41,6
Urin 10	263,7
Mixurin	603,6

Mit Hilfe dieser endogenen Konzentrationen wurden nun die IPG $F_{2\alpha}$ -Werte der durch Verdünnung oder Aufdotierung hergestellten Kalibratoren berechnet (s. Tab. 6.21).

Tab. 6.21.: Konzentrationen der für die Grenzwertbestimmung verwendeten Kalibratoren

Kalibrator	Surine	IPG $F_{2\alpha}$ [pg/mL]		
		Urin 2	Urin 10	Mixurin
L1	5	4,2	6,6	6
L2	10	10,4	13,2	15,1
L3	20	20,8	26,4	30,2
L4	40	41,6	52,7	60,4
L5	60	61,6	79,1	90,5
L6	80	81,6	105,5	120,7
L7	100	101,6	131,9	150,9

Die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurde nach unterschiedlichen Verfahren durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.22 vergleichend zusammengefasst, dabei wurden alle Werte auf ganze Zahlen gerundet.

Tab. 6.22.: Zusammenfassung der Validierungsdaten der Grenzwertbestimmung

Matrix	Nachweisgrenze (NG) [pg/mL]				Bestimmungsgrenze (BG) [pg/mL]				
	Eurachem /				Eurachem /				SANTE /
	S/N	NordVal	DIN	ICH	S/N	NordVal	DIN	ICH	FDA
Surine	1	7	15	13	3	23	50	41	20
Urin 2	1	5	15	16	3	17	48	48	4
Urin 10	1	6	10	14	3	19	32	44	13
Mixurin	1	6	16	17	3	20	53	53	6

Die Bestimmung des Signal-Rausch-Verhältnisses (S/N) erfolgte mit Hilfe der für die Quantifizierung verwendeten Software MultiQuant (Sciex). Das durchschnittliche Signal-Rausch-Verhältnis des jeweils niedrigsten Kalibrators wurde dabei auf einen IPG $F_{2\alpha}$ -Gehalt bei $S/N = 3$ (für die Nachweisgrenze (NG)) bzw. $S/N = 10$ (für die Bestimmungsgrenze (BG)) extrapoliert.

Das Verfahren nach Eurachem [200] entsprach dem von NordVal [201] und verwendete einen Multiplikator (3 bei NG, 10 bei BG) auf die Standardabweichung der Messungen von niedrig aufgestockten Proben, welche in der Nähe der zu erwartenden Nachweisgrenze dotiert wurden. Zur Berechnung wurde die durchschnittliche Standardabweichung der jeweils vier niedrigsten Kalibratoren jeder Matrix verwendet.

Die Berechnung nach dem DIN-Verfahren erfolgte mit Hilfe der Software VALISTAT, einer Software speziell für die Validierung forensischer Methoden nach Vorgaben der GTFCh (Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie). Die Software verwendet einen Erweiterungsfaktor $k = 3$ und ein Signifikanzniveau von 99 % zur Berechnung.

Das vom International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) [202] beschriebene Berechnungsverfahren ähnelte demjenigen der DIN-Norm, auch hier wurde zur Auswertung ein Kalibriergeradenverfahren verwendet. Der Quotient aus Standardabweichung des Signals und Steigung der Regressionsgeraden wurde dabei mit einem Faktor

multipliziert (3,3 für NG bzw. 10 für BG), wobei die Standardabweichung des Signals auf unterschiedliche Arten bestimmt werden kann [193, 202]. Hier wurde die Standardabweichung der Residuen der Kalibration verwendet, da auf diese Art sehr konservative Grenzwerte ermittelt werden [193].

Bei einem oft zur Festlegung der Bestimmungsgrenze benutzten Verfahren der Generaldirektion Gesundheit und Lebensmittelsicherheit der EU (SANTE) [198] bzw. der U. S. Food and Drug Administration (FDA) [196] müssen Präzisionsvorgaben eingehalten werden, der Variationskoeffizient darf 20 % nicht übersteigen. Dazu wurde die Präzision der Bestimmung aller Kalibratoren auf dem jeweiligen Konzentrationsniveau verglichen und geprüft, ab wann der Variationskoeffizient (VK) die Vorgabe von ≤ 20 % einhielt.

Unter Berücksichtigung einer optischen Auswertung der Chromatogramme erscheinen die über das S/N-Verfahren berechneten Werte unrealistisch niedrig. Bezüglich der Nachweisgrenze waren die Ergebnisse der übrigen Verfahren plausibel, bei der Festlegung der Bestimmungsgrenze ergab auch das VK-Verfahren nach SANTE/FDA teilweise im Vergleich sehr geringe Werte. Das Ansatz nach Eurachem und NordVal berechnet üblicherweise Bestimmungsgrenzen, welche in der Praxis gut funktionieren und realistische Werte im Vergleich zu einer optischen Auswertung ergeben. DIN und ICH ergaben sehr konservative Grenzwerte, was unter bestimmten Bedingungen (beispielsweise zur Überwachung von Grenzwerten mit möglichen folgenden Sanktionen) seine Berechtigung hat. Aufgrund der visuellen Auswertung der Messungen wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach dem Eurachem/NordVal-Verfahren als realistisch für die vorliegende Methode angesehen.

6.10.7. Verschleppung

Ein übliches in der LC-MS/MS-Methodenentwicklung beobachtetes Problem ist Verschleppung, dadurch kann beispielsweise die Präzision eines Verfahrens beeinflusst werden [175]. Aus anderen zur Validierung durchgeführten Versuchen wurden vorhandene Daten zu einer Beurteilung potentieller Verschleppungen herangezogen (s. Abb. 6.51 und Abb. 6.52 auf der nächsten Seite).

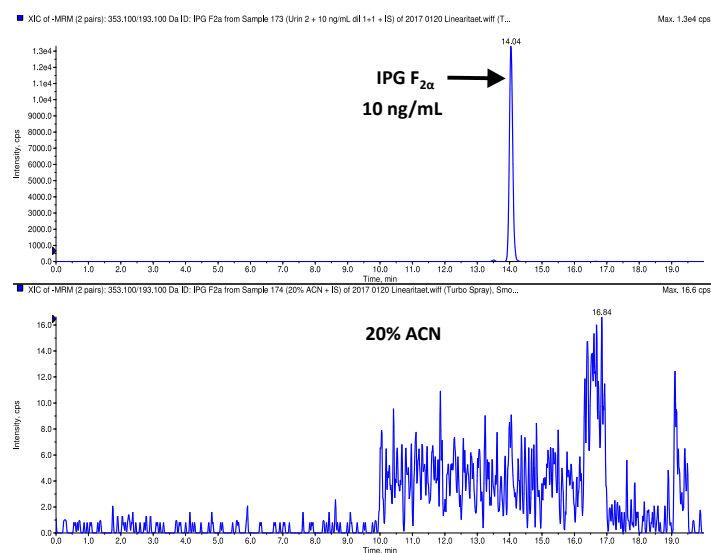


Abb. 6.51.: Darstellung der Prüfung auf potentielle Verschleppung durch das Messverfahren; oben: Chromatogramm einer Injektion von 10 ng/mL IPG F_{2α} in Urin Nr. 2 (Creatinin 137 mg/L); unten: Spüllauf mit 20 % (v/v) Acetonitril in Wasser, direkt danach injiziert. Im Spüllauf ist zur Retentionszeit von IPG F_{2α} keine Verschleppung erkennbar.

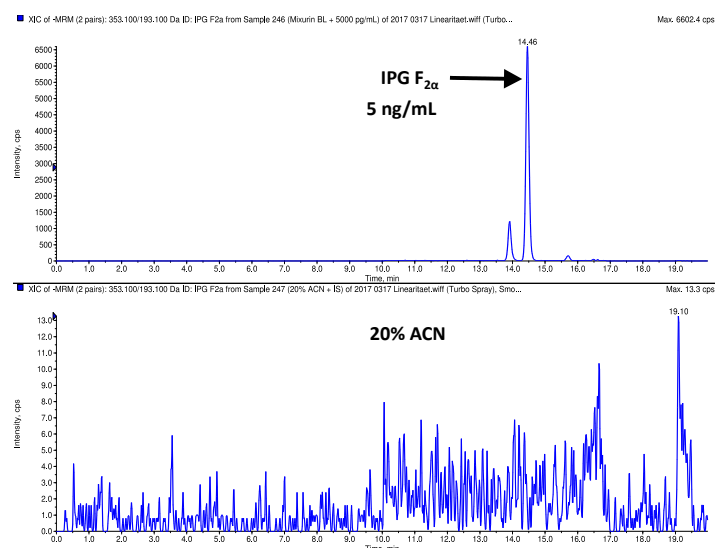


Abb. 6.52.: Darstellung der Prüfung auf potentielle Verschleppung durch das Messverfahren; oben: Chromatogramm einer Injektion von 5 ng/mL IPG F_{2α} in Mixurin (Creatinin 4302 mg/L); unten: Spüllauf mit 20 % (v/v) Acetonitril in Wasser, direkt danach injiziert. Im Spüllauf ist zur Retentionszeit von IPG F_{2α} keine Verschleppung erkennbar.

In beiden Fällen war in der auf die hochkonzentrierten und dotierten Realproben direkt folgenden Injektion von Lösungsmittel kein über das Grundrauschen hinausgehendes Signal zu erkennen. In der Messroutine sollten IPG F_{2α}-Konzentrationen von 25-5000 pg/mL verwendet werden, in diesem Bereich war keine Verschleppung des Systems zu erwarten.

6.10.8. Zusammenfassung der Validierung

Aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten Validierungsversuche wurde die vorhandene Methode für den angedachten Einsatzzweck als geeignet betrachtet.

6.11. Bestimmung von IPG $F_{2\alpha}$ in Urinen von Tauchern vor und nach einem Tauchgang

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 78 Probensets bestehend aus jeweils drei Proben (vor, nach und sechs Stunden nach einem Tauchgang) und somit insgesamt 234 Urinproben von Tauchern untersucht ($n = 234$). Die Gewinnung der Proben wurde vollständig anonym durchgeführt, eine Rückverfolgbarkeit oder Zuordnung der Ergebnisse zu individuellen Tauchern ist nicht möglich. Die Proben waren derart gekennzeichnet, dass zusammengehörige Proben eines Sets erkennbar waren, aber ohne Hinweise auf den jeweiligen Taucher. Im Rahmen der Auswertung wurden Daten zu den Tauchgängen verwendet, welche freundlicherweise von Dr. Wataru Kähler vom Schiffahrtsmedizinischen Institut der Marine zur Verfügung gestellt wurden.

6.11.1. Bestimmung des Creatiningehalts

Das Stoffwechselprodukt Creatinin kann als ein Maß für die Urinkonzentration betrachtet werden. Urine unterliegen bezüglich der Creatininkonzentration physiologisch einer außerordentlich großen intra- und interindividuellen Schwankungsbreite mit einem bei Männern häufig verwendeten Normbereich von 390-2590 mg/L. [203]

Eine Darstellung der Creatininverteilungen (s. Abb. 6.53) zeigte Unterschiede im Creatiningehalt zwischen den verschiedenen Zeitpunkten der Probenahme bzw. der Gesamtheit der im Rahmen dieser Untersuchungen gemessenen Urine.

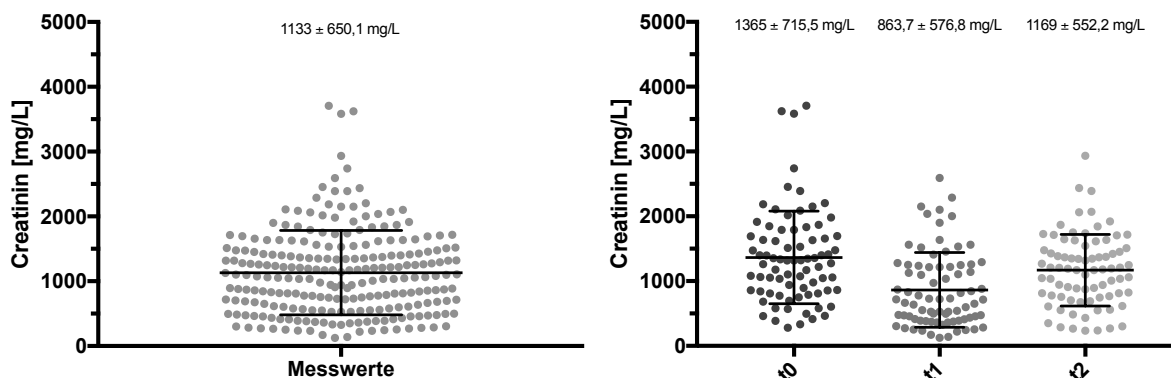


Abb. 6.53.: Darstellung der Verteilung der Creatininkonzentrationen; links: Messwerte von allen Proben der Taucher ($n = 234$), rechts: Proben sortiert nach Zeitpunkt der Probenahme mit t_0 = vor, t_1 = nach und t_2 = 6 h nach dem Tauchgang, je $n = 78$); direkt nach einem Tauchgang war die Creatininkonzentration geringer als zu den anderen Zeitpunkten.

Die Urine waren im Median bezogen auf den Wert aller gemessenen Urine ($n = 234$) vor einem Tauchgang (t_0) um +22 % konzentrierter (s. Tab. 6.23 auf der nächsten Seite). Direkt nach den Tauchgängen (t_1) sank die Creatininkonzentration der Urine im Median um -34 % ab und stieg nach 6 Stunden (t_2) auf +10 % des Medians aller Urine an. Die Urinproben waren damit im Median aller Messwerte sowie vor und sechs Stunden nach einem Tauchgang konzentrierter als in der Angabe des Normbereichs, nur direkt nach einem Tauchgang lag die Creatininkonzentration unterhalb des Medians vom Normbereich (s. Tab. 6.23 auf der nächsten Seite). Das in Tabelle 6.23 auf der nächsten Seite angegebene 95. Perzentil (zwischen der 2,5ten und 97,5ten Perzentile) bezogen auf die Creatininbestimmung aller hier gemessenen Urine stimmte im Wesentlichen mit den Angaben des Normbereichs überein. Die Creatininwerte waren in der Gesamtheit sehr ähnlich zu denjenigen Urinen, die üblicherweise in einem klinisch-chemischen Labor gemessen werden [204]. Dabei waren

die Werte vor einem Tauchgang (t_0) zu höheren Creatiningehalten verschoben, die Werte direkt nach einem Tauchgang (t_1) tendierten zu niedrigeren Werten. Die Urinproben sechs Stunden nach den Tauchgängen (t_2) lagen sehr ähnlich zum Normbereich (s. Tab. 6.23).

Tab. 6.23.: Zusammenfassung der Daten zur Creatininverteilung

	Creatinin [mg/L]					
	Mittelwert	[%]	Median	[%]	2,5te Perzentile	97,5te Perzentile
alle Urine (n = 234)	1133	100	1079	100	236	2609
t_0 (n = 78)	1365	120	1318	122	332	3625
t_1 (n = 78)	864	76	716	66	138	2298
t_2 (n = 78)	1169	103	1185	110	239	2450
Normbereich [204]	975	86	802	74	256	2660

Alle Angaben wurden auf ganze Zahlen gerundet.

Mit Hilfe der Statistiksoftware Graphpad PRISM wurden die Ergebnisse der Creatininmessungen per einfaktoriellem ANOVA-Test (gepaart, Mehrfachvergleich nach Tukey, $p = 0,05$) verglichen (s. Abb. 6.54). Bezogen auf die absoluten Creatininwerte (1365 mg/L) vor einem Tauchgang (t_0) lagen die Messwerte direkt nach dem Tauchgang (t_1) signifikant niedriger (864 mg/L) und sechs Stunden nach einem Tauchgang (t_2) nicht signifikant verändert vor (1169 mg/L). Der signifikante Unterschied zwischen t_1 und t_2 spiegelte die Normalisierung der Urinkonzentration im Zeitraum zwischen direkt nach dem Tauchgang und sechs Stunden später wieder (s. Abb. 6.54).

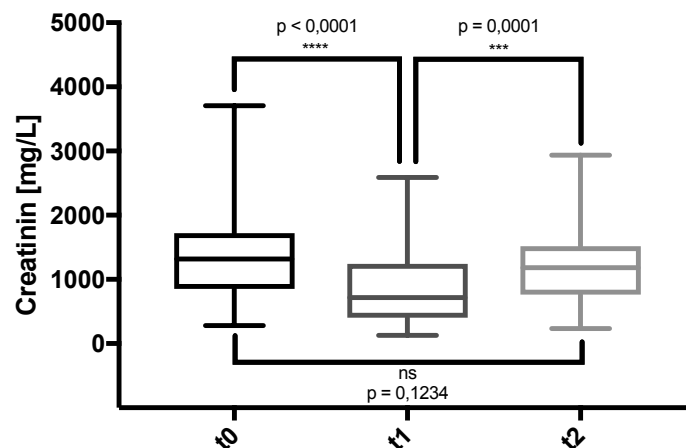


Abb. 6.54.: Vergleich der Creatininkonzentrationen mittels ANOVA ($p = 0,05$), sortiert nach Zeitpunkt der Probenahme mit t_0 = vor, t_1 = nach und t_2 = 6 h nach dem Tauchgang (je $n = 78$). Die Creatininwerte direkt nach einem Tauchgang (t_1) waren signifikant niedriger im Vergleich zu den Messwerten vor einem Tauchgang (t_0). Die Proben sechs Stunden nach einem Tauchgang (t_2) zeigten bezogen auf den Zeitpunkt t_0 keine signifikante Veränderung.

6.11.2. Bestimmung von IPG F_{2α}

Im Rahmen der Bestimmung von IPG F_{2α} in Urinen von Tauchern wurden in jeder Sequenz Kontrollproben (QC) zu Beginn, in der Mitte und zum Schluss einer Serie als Qualitätsmerkmal gemessen (s. Tab. 6.24). Beide Qualitätskontrollen (niedrig und hoch) zeigten durchschnittlich weniger als 3 % Abweichung vom Sollwert, die relative Standardabweichung aller gemessenen Kontrollproben lag bei unter 4 % auf jedem Konzentrationsniveau (s. Tab. 6.24). Die durchgeführten Messungen wurden daher als ausreichend präzise und genau angesehen.

Tab. 6.24.: Zusammenfassung der Ergebnisse der Qualitätskontrollen

	QC niedrig	QC hoch	Einheit
Sollwert	100	1000	pg/mL
Messwerte	103,1	1060,7	pg/mL
	94,0	1003,5	
	96,6	1015,1	
	99,1	1011,5	
	97,1	954,3	
	95,1	1029,3	
	100,4	1052,0	
	97,7	1015,0	
	93,0	1077,3	
Mittelwert	97,3	1024,3	pg/mL
RSD	3,3	3,6	%
abs. Abweichung vom Sollwert	-2,7	24,3	pg/mL
rel. Abweichung vom Sollwert	-2,7	2,4	%

Die Kalibration von IPG F_{2α} erfolgte arbeitstäglich in einem Bereich von 25-5000 pg/mL. Die Messwerte von zwei Urinproben lagen unterhalb dieser Kalibration (< 25 pg/mL). Diese Ergebnisse wurden extrapoliert und dennoch für die Auswertung verwendet, diese zwei Proben unterlagen damit einer geringeren Präzision als die übrigen 232 Messwerte. Beide betroffenen Signale waren deutlich über der Nachweisgrenze des Verfahrens und konnten problemlos integriert werden.

Die Verteilung der IPG F_{2α}-Messwerte (s. Abb. 6.55 auf der nächsten Seite) zeigte bei nur geringen Unterschieden im Mittelwert eine deutlich geringere Streuung der auf den Creatiningehalt des jeweiligen Urins bezogenen Angabe. Dieses lag an der großen physiologischen Schwankungsbreite der Urinkonzentration, für welche Creatinin als Marker verwendet wurde. Eine Normierung der IPG F_{2α}-Werte auf den Creatiningehalt bewirkte daher einen Ausgleich der unterschiedlichen Urinkonzentrationen.

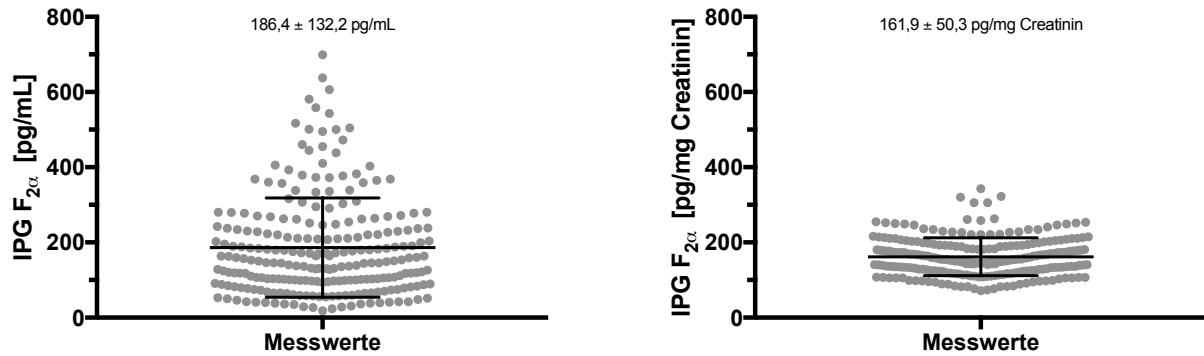


Abb. 6.55.: Darstellung der Verteilung der IPG $F_{2\alpha}$ -Messwerte aller Proben ($n = 234$); links: absolute Werte in pg/mL, rechts: auf Creatinin bezogene Werte in pg/mg Creatinin. Eine große Streuung der absoluten Messwerte (linker Teil der Abbildung) konnte durch Normierung auf den Creatiningehalt der Urinproben (rechter Teil der Abbildung) und damit Berücksichtigung der Konzentration der Urine reduziert werden.

Die IPG $F_{2\alpha}$ -Resultate wurde mit Hilfe der Statistiksoftware Graphpad PRISM per einfaktoriellem ANOVA-Test (gepaart, Mehrfachvergleich nach Tukey, $p = 0,05$) verglichen (s. Abb. 6.56).

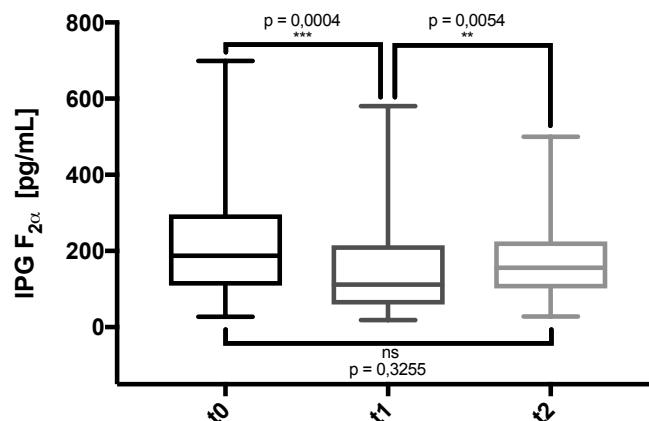


Abb. 6.56.: Vergleich der absoluten IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen der Urinproben mittels ANOVA ($p = 0,05$), sortiert nach Zeitpunkt der Probenahme mit t_0 = vor, t_1 = nach und t_2 = 6 h nach dem Tauchgang (je $n = 78$). Die absoluten Werte von IPG $F_{2\alpha}$ direkt nach einem Tauchgang (t_1) lagen signifikant niedriger im Vergleich zu den Messwerten vor einem Tauchgang (t_0).

Die Unterschiede von vor dem jeweiligen Tauchgang (t_0) zu direkt nach dem Tauchgang (t_1) sowie zwischen t_1 und sechs Stunden nach dem Tauchgang (t_2) waren dabei statistisch signifikant (s. Abb. 6.56). Die absoluten Werte von IPG $F_{2\alpha}$ direkt nach einem Tauchgang (t_1) lagen signifikant niedriger im Vergleich zu den Messwerten vor einem Tauchgang (t_0). Dieses lag an der geringeren Konzentration der Urine nach dem Tauchgang, was an der geringeren Creatininkonzentration erkennbar war (s. unter 6.11.1 auf Seite 112).

Zum Ausgleich der Urinkonzentrationen wurde eine Normierung der Messwerte durchgeführt. Ein Vergleich der auf den Creatiningehalt der Urine normierten IPG $F_{2\alpha}$ -Werte wurde mittels Graphpad PRISM per einfaktoriellem ANOVA-Test (gepaart, Mehrfachvergleich nach Tukey, $p = 0,05$) durchgeführt (s. Abb. 6.57). Die Veränderungen vor dem jeweiligen Tauchgang (t_0) zu direkt nach dem Tauchgang (t_1) oder zu sechs Stunden danach (t_2) sowie zwischen t_1 und t_2 waren auf die Urinkonzentration in Form von Creatinin bezogen jeweils signifikant.

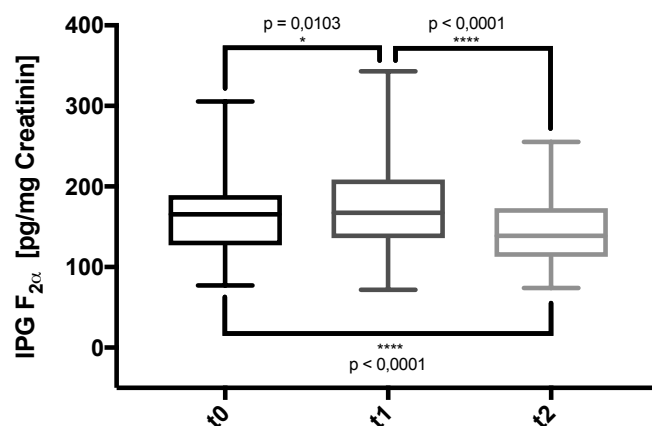


Abb. 6.57.: Vergleich der auf Creatinin normierten IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen der Urinproben mittels ANOVA ($p = 0,05$), sortiert nach Zeitpunkt der Probenahme mit t_0 = vor, t_1 = nach und t_2 = 6 h nach dem Tauchgang (je $n = 78$). Die unter Berücksichtigung der Urinkonzentration normierten Werte von IPG $F_{2\alpha}$ direkt nach einem Tauchgang (t_1) lagen signifikant höher im Vergleich zu den normierten Messwerten vor einem Tauchgang (t_0).

Die Auswertung der auf Creatinin normierten IPG $F_{2\alpha}$ -Werte zeigte einen signifikanten Anstieg direkt nach einem Tauchgang (t_1) auf im Median 105,9 % (Mittel 110,3 %). Nach einer Zeitspanne von sechs Stunden (t_2) sanken die Werte signifikant bezogen auf den Zeitpunkt t_0 , im Median lagen die Ergebnisse unterhalb des Ausgangswertes vor dem Tauchgang bei 89,4 % (Mittel 91,4 %) (s. Tab. 6.25).

Tab. 6.25.: Zusammenfassung der Veränderung der IPG $F_{2\alpha}$ -Werte der Urinproben bezogen auf Creatinin im Vergleich zum Zeitpunkt t_0

	t_1 [%]	t_2 [%]
Mittelwert	110,3	91,4
Median	105,9	89,4

6.11.3. Korrelation der Veränderung der IPG $F_{2\alpha}$ -Werte mit der Sauerstoffbelastung durch Tauchgänge

Die Proben stammten aus insgesamt 78 Tauchgängen, bei jedem Tauchgang wurde ein Set bestehend aus jeweils drei Urinproben (vor und nach dem Tauchgang, sowie sechs Stunden später) genommen. Von den 78 Tauchgängen entsprachen 48 Probensets (62 %) der Hypothese und zeigten einen Anstieg direkt nach dem Tauchgang, bei 30 Sets (38 %) war kein Anstieg feststellbar (s. Tab. 6.26).

Die Tauchgänge wurden anhand ihrer Messergebnisse kategorisiert ($n = 78$). Aus den jeweiligen Veränderungen der zusammengehörigen Proben eines Tauchgangs (vor und direkt danach) bezüglich IPG $F_{2\alpha}$ pro Creatinin wurden vier Klassen gebildet (s. Tab. 6.26).

Tab. 6.26.: Klassifizierung der Tauchgänge ($n = 78$) anhand der Veränderung der IPG $F_{2\alpha}$ -Messwerte bezogen auf Creatinin

Klasse	Anzahl	%	Wirkung
> 20 % Steigerung	21	27	Responder 62 %
10-20 % Steigerung	12	15	
0-10 % Steigerung	15	19	
kein Anstieg	30	38	Nonresponder 38 %

Zur Prüfung der Fragestellung nach einem Zusammenhang zwischen der Belastung mit Sauerstoff und einem Anstieg der IPG $F_{2\alpha}$ -Messwerte direkt nach einem Tauchgang wurde eine Korrelation durchgeführt. Dazu wurde eine Normierung der Sauerstofflast der einzelnen Tauchgänge durchgeführt und dazu die Berechnung nach Kähler et al. [2] verwendet:

$$\text{Sauerstofflast [bar x L]} = \text{Sauerstoffpartialdruck pO}_2 \text{ [bar]} \times \text{Tauchzeit [min]} \times \text{Sauerstoffverbrauch VO}_2 \text{ [L/min]}$$

Die zur Berechnung der Sauerstofflast erforderlichen Daten wurden freundlicherweise von Dr. Wataru Kähler vom Schifffahrtmedizinischen Institut der Marine zur Verfügung gestellt. Es lagen nicht von allen Tauchgängen die zur Berechnung der Sauerstofflast nötigen Daten vor, daher konnten nur 69 Tauchgänge in der Korrelation berücksichtigt werden ($n = 69$).

Auf der folgenden Abbildung 6.58 wird die Korrelation der Sauerstofflast jedes Tauchgangs ($n = 69$) mit der Veränderung des entsprechenden IPG $F_{2\alpha}$ -Messwertes pro Creatinin dargestellt.

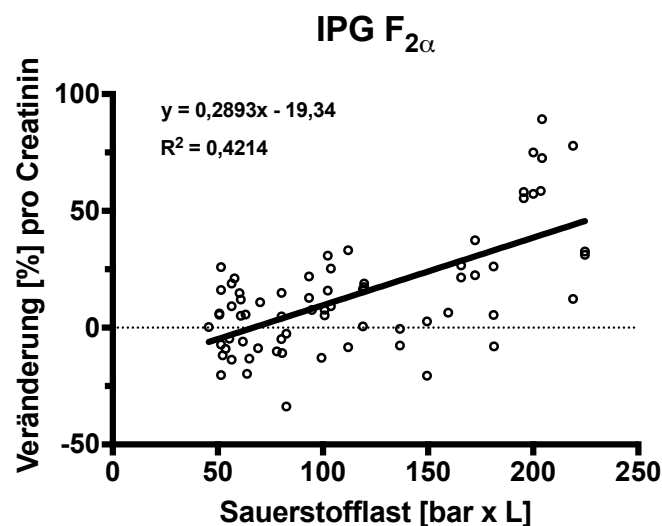


Abb. 6.58.: Darstellung der Korrelation der prozentualen Veränderung von IPG $F_{2\alpha}$ pro Creatinin ($n = 69$) mit der Sauerstofflast (s. unter 6.11.3) durch die Tauchgänge; es lagen nur zu 69 von insgesamt 78 Tauchgängen die zur Berechnung der Sauerstofflast nötigen Daten vor.

Die lineare Regression wurde mit dem Programm Graphpad PRISM durchgeführt. Sie zeigt einen signifikant linearen Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,4214$.

6.12. Bestimmung von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ als potentieller alternativer Biomarker

Das Isomer 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ war in jeder Probe nachweisbar, da es unter den verwendeten Bedingungen zwar chromatographisch von IPG $F_{2\alpha}$ getrennt, aber nicht über das SelexION ausgeblendet wurde. Dieses ermöglichte eine Quantifizierung von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ um zu prüfen, ob dieses Isomer als alternativer Biomarker im Vergleich zu IPG $F_{2\alpha}$ verwendbar war. Dazu wurden die bereits durchgeführten Messungen verwendet, indem eine Kalibration von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ nachträglich erstellt und die Proben damit retrospektiv ausgewertet wurden. Die Verteilung der 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Messwerte (s. Abb. 6.59) zeigte bei nur geringen Unterschieden im Mittelwert eine deutlich geringere Streuung der auf den Creatiningehalt des jeweiligen Urins bezogenen Angabe. Auch hier bewirkte eine Normierung auf den Creatiningehalt einen Ausgleich der unterschiedlichen Urinkonzentrationen.

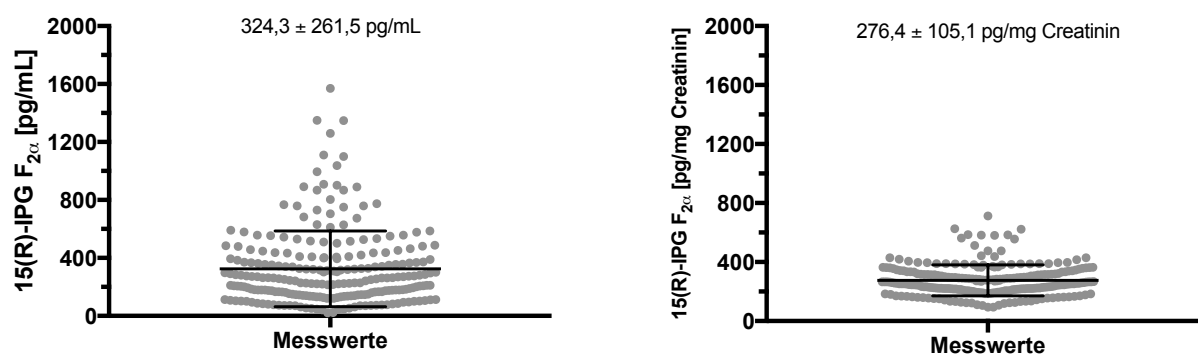


Abb. 6.59.: Darstellung der Verteilung aller 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Messwerte ($n = 234$); links: absolute Werte in pg/mL, rechts: auf Creatinin bezogene Werte in pg/mg Creatinin. Eine große Streuung der absoluten Messwerte (linker Teil der Abbildung) konnte durch Normierung auf den Creatiningehalt der Urinproben (rechter Teil der Abbildung) und damit Berücksichtigung der Konzentration der Urine deutlich reduziert werden.

Die 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Resultate wurden mit Hilfe der Statistiksoftware Graphpad PRISM per einfaktoriellem ANOVA-Test (gepaart, Mehrfachvergleich nach Tukey, $p = 0,05$) verglichen (s. Abb. 6.60 auf der nächsten Seite).

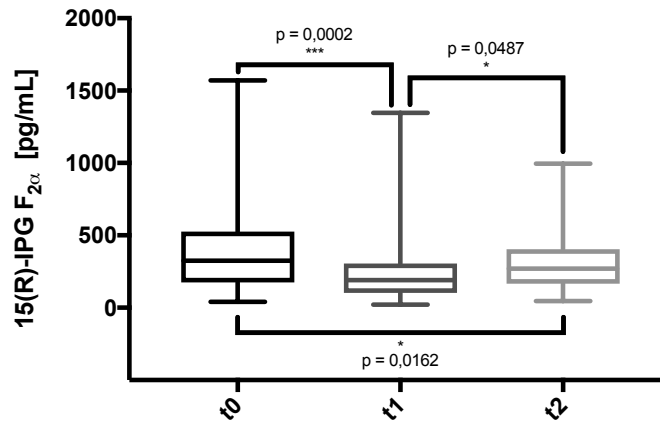


Abb. 6.60.: Vergleich der absoluten 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen der Urinproben mittels ANOVA ($p = 0,05$), sortiert nach Zeitpunkt der Probenahme mit t_0 = vor, t_1 = nach und t_2 = 6 h nach dem Tauchgang (je $n = 78$). Die Werte von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ direkt nach einem Tauchgang (t_1) lagen signifikant niedriger im Vergleich zu den Messwerten vor einem Tauchgang (t_0).

Die Unterschiede der absoluten 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Werte vor dem jeweiligen Tauchgang (t_0) zu direkt nach dem Tauchgang (t_1) oder zu sechs Stunden danach (t_2) sowie zwischen t_1 und t_2 waren signifikant (s. Abb. 6.60). Die absoluten Werte von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ direkt nach einem Tauchgang (t_1) lagen signifikant niedriger im Vergleich zu den Messwerten vor einem Tauchgang (t_0). Dieses lag an der geringeren Konzentration der Urine nach dem Tauchgang, was an der geringeren Creatininkonzentration erkennbar war (s. unter 6.11.1 auf Seite 112).

Zum Ausgleich der Urinkonzentrationen wurde eine Normierung der Messwerte durchgeführt. Ein Vergleich der auf den Creatiningehalt der Urine normierten 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Werte wurde mittels Graphpad PRISM per einfaktoriellem ANOVA-Test (gepaart, Mehrfachvergleich nach Tukey, $p = 0,05$) durchgeführt (s. Abb. 6.61). Hierbei wurde lediglich die Veränderung vor dem jeweiligen Tauchgang (t_0) zu sechs Stunden danach (t_2) als signifikant bewertet (s. Abb. 6.61).

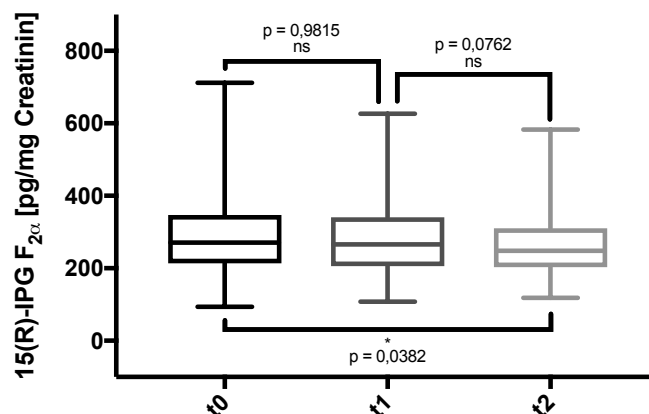


Abb. 6.61.: Vergleich der auf Creatinin normierten 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen der Urinproben mittels ANOVA ($p = 0,05$), sortiert nach Zeitpunkt der Probenahme mit t_0 = vor, t_1 = nach und t_2 = 6 h nach dem Tauchgang (je $n = 78$). Die unter Berücksichtigung der Urinkonzentration normierten Werte von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ direkt nach einem Tauchgang (t_1) zeigten keine signifikante Veränderung im Vergleich zu den normierten Messwerten vor einem Tauchgang (t_0).

Die Auswertung der auf Creatinin normierten 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Werte bezogen auf den Zeitpunkt vor dem jeweiligen Tauchgang (t_0) zeigte keine signifikanten Veränderungen (s. Tab. 6.27). Direkt nach einem Tauchgang (t_1) stiegen die Werte im Median auf 101,4 % (Mittel 104,2 %) an, und sanken zum Zeitpunkt sechs Stunden nach einem Tauchgang (t_2) auf im Median 92,0 % (Mittel 98,7 %). Die Veränderungen in Mittelwert und Median waren bezüglich 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ weniger stark ausgeprägt als bei IPG $F_{2\alpha}$ (vgl. Tab. 6.25 auf Seite 116).

Tab. 6.27.: Zusammenfassung der Veränderung der 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Werte der Urinproben bezogen auf Creatinin im Vergleich zum Zeitpunkt t_0

	t_1 [%]	t_2 [%]
Mittelwert	104,2	98,7
Median	101,4	92,0

6.12.1. Korrelation der Veränderung der 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Werte mit der Sauerstoffbelastung durch Tauchgänge

Die Vorgehensweise zur Kategorisierung entspricht der von IPG $F_{2\alpha}$ (s. hierzu unter 6.11.3 auf Seite 116). Nach Auswertung der 78 Tauchgänge bezüglich der Messwerte von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ entsprachen 41 Probensets (53 %) der Hypothese und zeigten einen Anstieg direkt nach dem Tauchgang, bei 37 Sets (47 %) war kein Anstieg feststellbar (s. Tab. 6.28).

Die Tauchgänge wurden anhand ihrer Messergebnisse kategorisiert ($n = 78$). Ebenso wie bei IPG $F_{2\alpha}$ wurde auch hier aus den jeweiligen Veränderungen der zusammengehörigen Proben eines Tauchgangs (vor und direkt danach) bezüglich 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ pro Creatinin vier Klassen gebildet (s. Tab. 6.28).

Tab. 6.28.: Klassifizierung der Tauchgänge ($n = 78$) anhand der Veränderung von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ bezogen auf Creatinin

Klasse	Anzahl	%	Wirkung
> 20 % Steigerung	14	18	Responder 53 %
10-20 % Steigerung	12	15	
0-10 % Steigerung	15	19	
kein Anstieg	37	47	Nonresponder 47 %

Zur Prüfung der Fragestellung nach einem Zusammenhang zwischen der Belastung mit Sauerstoff und einem Anstieg der IPG $F_{2\alpha}$ -Messwerte direkt nach einem Tauchgang wurde eine Korrelation durchgeführt. Einzelheiten zur Normierung und Berechnung der Sauerstofflast zwecks Korrelation entsprechen der Vorgehensweise bei IPG $F_{2\alpha}$ (s. unter 6.11.3 auf Seite 117). Die zur Berechnung der Sauerstofflast erforderlichen Daten wurden freundlicherweise von Dr. Wataru Kähler vom Schiff-fahrtmedizinischen Institut der Marine zur Verfügung gestellt. Es lagen nicht von allen Tauchgängen die zur Berechnung der Sauerstofflast nötigen Daten vor, daher konnten nur 69 Tauchgänge in der Korrelation berücksichtigt werden ($n = 69$).

Auf der folgenden Abbildung 6.62 auf der nächsten Seite wird die Korrelation der Sauerstofflast jedes Tauchgangs ($n = 69$) mit der Veränderung des entsprechenden 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Messwertes pro Creatinin dargestellt.

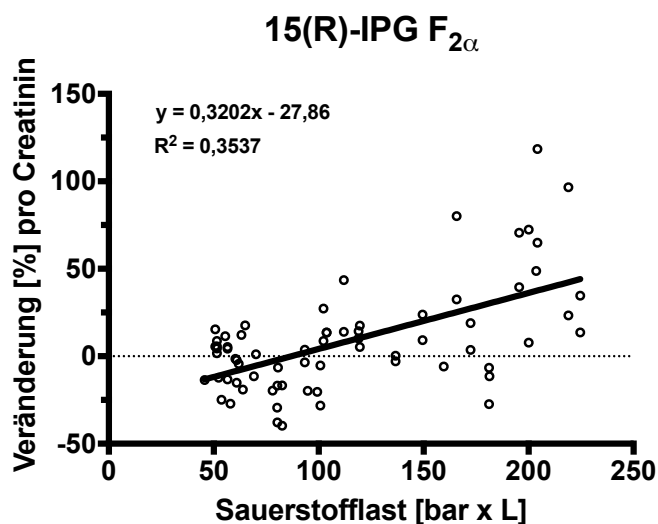


Abb. 6.62.: Korrelation der Veränderung von 15(R)-IPG F_{2α} pro Creatinin (n = 69) mit der Sauerstofflast (s. unter 6.11.3 auf Seite 117) durch die Tauchgänge; es lagen nur zu 69 von insgesamt 78 Tauchgängen die zur Berechnung der Sauerstofflast nötigen Daten vor.

Die lineare Regression zeigt dabei einen signifikant linearen Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,3537$.

6.13. Vergleich von IPG F_{2α}-Messungen mit und ohne Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS)

Anhand von Realmatrix in Form der Taucher-Urinproben (n = 234) wurden die Messungen ohne DMS und die Ergebnisse mit SelexION verglichen. Zum Methodenvergleich wurden die absoluten IPG F_{2α}-Messwerte korreliert, sowie ein t-Test (gepaart, zweiseitig, p = 0,05) durchgeführt und ein Bland-Altman-Plot erstellt (s. Abb. 6.63).

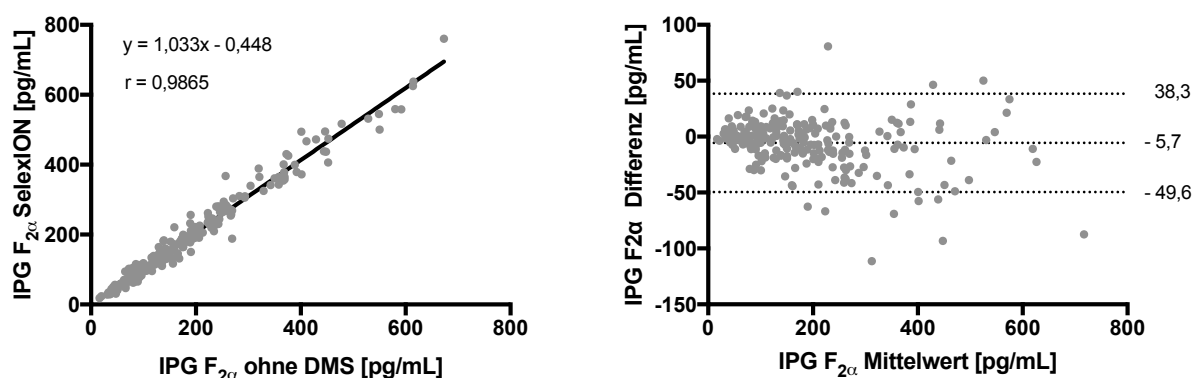


Abb. 6.63.: Darstellung des Methodenvergleichs aller IPG F_{2α}-Messungen (n = 234) mit und ohne DMS; links: Korrelation der Messungen mit SelexION gegen die Ergebnisse ohne DMS; rechts: Bland-Altman-Plot des Vergleichs (incl. Differenzmittelwert und 95 % Konfidenzintervall).

Der t-Test ($p = 0,001$) ergab einen signifikanten Unterschied beider Messreihen. Der Korrelation nach betrug die systematische Abweichung 3,3 %. Dieses stimmte mit dem Bland-Altman-Methodenvergleich überein, welcher eine mittlere Differenz von 5,7 pg/mL berechnete bei einem IPG $F_{2\alpha}$ -Mittelwert von 183,6 pg/mL ohne DMS bzw. 189,2 pg/mL mit SelexION (s. Abb. 6.64). Die Messwerte waren ohne DMS somit systematisch und statistisch signifikant um ca. 3 % geringer als bei Verwendung des SelexION-Moduls.

In Abbildung 6.64 wurde zunächst die Verteilung der absoluten Messwerte dargestellt. Bezüglich Mittelwert und Streuung in der Form der Standardabweichung ($183,6 \pm 128,1$ pg/mL ohne DMS im Vergleich zu $189,2 \pm 134,2$ pg/mL mit SelexION) zeigten sich nur geringe Unterschiede, die aber gemäß des Methodenvergleichs signifikant und systematisch, aber für die praktische Anwendung nicht relevant waren.

Ein Vergleich der Signal-Rausch-Verhältnisse (S/N) der Urinproben ($n = 234$) ergab dagegen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Verfahren. Ohne DMS lag der S/N-Mittelwert der IPG $F_{2\alpha}$ -Signale mit 32 deutlich unter dem Wert bei Verwendung des SelexION von S/N 113. Das Signal-Rausch-Verhältnis verbesserte sich durch das SelexION im Durchschnitt um einen Faktor von 3,5 (s. Abb. 6.64). Die absolute Streuung stieg dabei um etwa den gleichen Faktor an, änderte sich aber relativ zum Messwert nicht und blieb als prozentuale Streuung gleich.

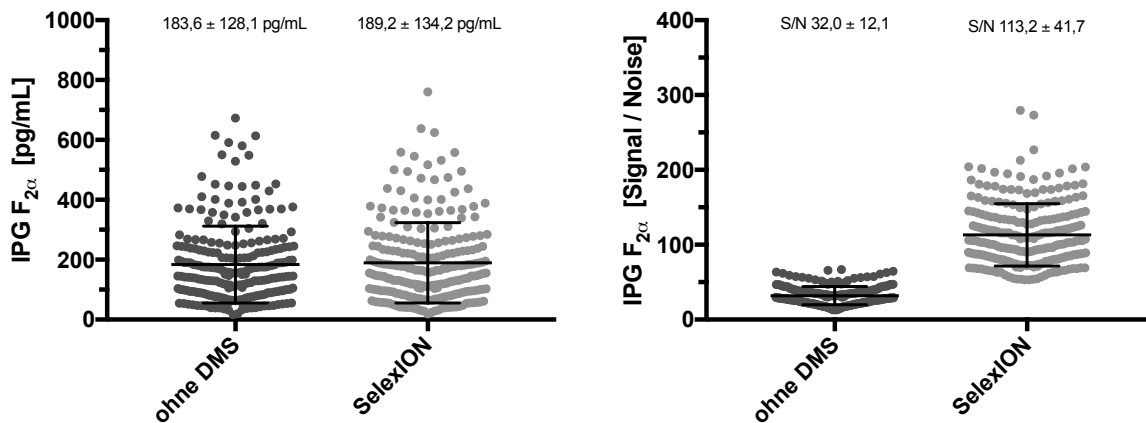


Abb. 6.64.: Darstellung des Vergleichs der IPG $F_{2\alpha}$ -Messungen der Taucherproben ($n = 234$) mit und ohne DMS; links: Vergleich der absoluten IPG $F_{2\alpha}$ -Ergebnisse in pg/mL; rechts: Vergleich der IPG $F_{2\alpha}$ -Messwerte in Form des Signal-Rausch-Verhältnisses (S/N).

7. Diskussion

Aufgrund des Bildungsmechanismus können viele isomere Isoprostan-Verbindungen im menschlichen Körper gebildet werden (s. hierzu unter 2.5.3 auf Seite 10). Aus der Vielzahl von theoretisch möglichen Isoprostanen gilt die Messung des Isomers IPG $F_{2\alpha}$ in Urin als nicht-invasives Maß für systemischen oxidativen Stress und wird als dessen Goldstandard der Analytik *in vivo* angesehen [51, 80, 156, 205]. Bereits kurz nach der Erstbeschreibung der Isoprostane im Jahr 1990 wurde die Verbindung IPG $F_{2\alpha}$ zum Referenzmarker der Analytik des oxidativen Stresses. Bei der Entdeckung der Isoprostane wurde ein intensives Signal mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie als IPG $F_{2\alpha}$ identifiziert. Obwohl zu diesem Zeitpunkt unbekannt war, dass dieses Signal aus mehreren Isomeren bestand (s. unter 2.6.3 auf Seite 19), war die Hypothese von IPG $F_{2\alpha}$ als Marker für oxidativen Stress funktional und hielt der Kritik bis heute stand. Dieses Isomer war in allen Körperflüssigkeiten messbar, stabil und von der Zusammensetzung der Nahrung unabhängig. Damit war auch eine Festlegung von Referenzbereichen möglich. Nach der Beschreibung der Isoprostane wurden schnell Standardsubstanzen der Verbindung IPG $F_{2\alpha}$ und zusätzlich ein isotopenmarkierter interner Standard kommerziell verfügbar, dadurch vereinfachte und verbreitete sich die Analytik des Biomarkers IPG $F_{2\alpha}$.

Die Adellung des Isomers IPG $F_{2\alpha}$ erfolgte im Rahmen der „Biomarkers of Oxidative Stress“ (BOSS) Studie [206]. Hierbei wurde dieses Isomer als einer von vielen potentiellen Markern für oxidativen Stress mit Hilfe von Tiermodellen evaluiert und validiert [44, 79, 110, 167, 207]. Die Ergebnisse der BOSS-Studie werden allgemein als Beweis der Verwendbarkeit von IPG $F_{2\alpha}$ als Marker zur Bestimmung des oxidativen Stresses angesehen. Zusätzlich wurde IPG $F_{2\alpha}$ in einem klinischen Humanmodell als sensibler Biomarker des oxidativen Stresses validiert und bestätigt [208]. Auch die European Food Safety Authority (EFSA) hat sich mit IPG $F_{2\alpha}$ befasst und dieses Isomer im Jahr 2011 offiziell als direkten Marker zur Bestimmung von oxidativen Schäden an Lipiden bzw. der Lipidperoxidation benannt [209].

Tauchen ist ein nahezu ideales Modell zur Untersuchung des oxidativen Stresses in Menschen (s. unter 2.4 auf Seite 6). Akute Veränderungen von IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen durch einen Tauchgang sind bisher nicht ausreichend untersucht worden. In der verfügbaren Literatur sind keine selektiven Quantifizierungen von IPG $F_{2\alpha}$ aus Urin von Tauchern beschrieben. Eine wesentliche Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand daher in der Entwicklung einer Messmethode zur selektiven Erfassung des Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ aus der komplexen Matrix Urin. Damit sollte geprüft werden, ob dieser als zur Bestimmung des oxidativen Stresses besonders geeignet beschriebene Marker ebenfalls bei Tauchern verwendet werden konnte.

Der Begriff Selektivität beschreibt die Fähigkeit einer Methode verschiedene Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren [210]. Alle Schritte einer chromatographischen Methode (wie Extraktion und Aufreinigung, Chromatographie und Detektion) tragen einen Teil zur Selektivität des Gesamtverfahrens bei. Selektive Extraktionen oder Aufreinigungsverfahren sind selten, bei Multimethoden oder zu extrahierenden Gruppen von Substanzen kann sich eine zu hohe Selektivität sogar störend auswirken. Bei komplexen biologischen Matrices sind übliche Extraktions- und Aufreinigungsverfahren wie Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) oder Festphasenextraktion (SPE) üblicherweise nicht selektiv für exakt eine Substanz (und damit spezifisch), da hier physikalische oder chemische Parameter wie Löslichkeit, Verteilung, Ionisierbarkeit oder Polarität zur Extraktion genutzt werden. Eine Abtrennung von Substanzen mit deutlichen Unterschieden in den physiko-chemischen Eigenschaften gelingt damit gut, sind diese jedoch sehr ähnlich, dann kommen solche Verfahren an ihre Grenzen. Selbst bei Immunoaffinitätsverfahren mit

ihrer durch die Verwendung von Antikörpern immanenten hohen Selektivität zur Extraktion eines Zielanalyten zeigt sich eine gewisse Kreuzreaktivität zu ähnlichen Substanzen oder Metaboliten, auch hier liegt keine spezifische Extraktion im engen Sinn vor. Je selektiver eine Extraktion oder Aufreinigung wird, desto größer ist üblicherweise der Arbeitsaufwand und umso mehr steigt die Gefahr von Verlusten des Zielanalyten.

Chromatographische Verfahren besitzen generell eine starke Trennkraft, damit ist dieses der Schritt einer LC-MS/MS-Methode, mit welchem sich eine Selektivität am einfachsten erreichen lässt. Die Trennleistung moderner Anlagen und Säulen kann außerordentlich hoch sein, dennoch ist die Selektion isobarer Substanzen und insbesondere von Stereoisomeren oft schwierig und benötigt beispielsweise bei Enantiomeren einen hohen Aufwand wie spezielle Chiralsäulen mit oft sehr langen Laufzeiten zur Trennung.

Ein spezifisches Detektionsverfahren ist ebenfalls selten, in der Praxis wird häufig die Kombination mit der chromatographischen Trennung verwendet um die nötige Selektivität zu erreichen. Selbst Detektionsarten wie MS/MS, MSⁿ oder hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) sind nicht per se spezifisch. Im Fall der Isoprostane mit der Besonderheit von vielen Isomeren ist die Tandem-Massenspektrometrie geeignet, um die vier vorliegenden Regiomerklassen zu differenzieren und dadurch beispielsweise den Subtypus des Zielanalyten IPG F_{2α} selektiv erfassen zu können (s. Abb. 6.1 auf Seite 60). Diese eine Regiomerkklasse besteht dabei immer noch aus insgesamt 32 isomeren Einzelsubstanzen (s. hierzu 2.5.3 auf Seite 10), welche über die Detektionsart MS/MS nicht weiter unterschieden werden können. Da es sich um Isomere mit identischen Fragmentmustern handelt, ergeben auch andere massenspektrometrische Detektionsarten wie MSⁿ oder HRMS keine Steigerung der Selektivität, da keine isomerspezifischen Fragmente vorliegen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS) hingegen erhöht die Selektivität aufgrund der Verwendung anderer physikalischer Prinzipien im Vergleich zur Chromatographie bzw. Tandem-Massenspektrometrie (s. unter 2.7 auf Seite 21 bzw. 7.2 auf Seite 136), ist aber alleine für sich betrachtet ebenfalls nur eine Komponente der Gesamtselektivität des analytischen Verfahrens.

7.1. Hypothese 1

Die selektive quantitative Analyse von Konzentrationsunterschieden an IPG F_{2α} in Urin von Tauchern ist geeignet, um den durch einen Tauchgang erhöhten oxidativen Stress zu erfassen.

Zur Prüfung der ersten Hypothese war es nötig, eine geeignete Messmethode zu entwickeln und deren Verwendbarkeit im Rahmen einer Validierung zu prüfen. In den Vorüberlegungen der Methodenentwicklung wurden mehrere Problemfelder identifiziert (s. unter 3.1 auf Seite 25), welche sich vorrangig auf die Themen Sensitivität bzw. Extraktion (a, s. unter 7.1), den Matrixeffekt (b, s. unter 7.1 auf Seite 127) und die Selektivität (c, s. unter 7.1 auf Seite 128) beziehen.

a) geringe Konzentration des Zielanalyten

Die zu etablierende Messmethode sollte eine präzise Quantifizierung ab etwa 25 pg IPG F_{2α} pro Milliliter Urin ermöglichen. Um die nötige Sensitivität des Verfahrens zu erreichen war zunächst die Entwicklung einer massenspektrometrischen und chromatographischen Messmethode nötig. Neben der Etablierung eines entsprechenden Extraktionsverfahrens aus der komplexen Biomatrix Urin musste als weiterer wesentlicher Einflussfaktor dabei die Matrixsuppression berücksichtigt werden (s. hierzu unter 7.1 auf Seite 127).

Bei der Aufzeichnung von Massenspektren der Referenzsubstanzen war ein bisher in der Literatur über Isoprostane nicht erwähntes Fragment m/z 43 auffällig (s. Tab. 6.1 auf Seite 55). Dieses

Fragment zeigte zwar eine große Signalstärke, allerdings im Verlauf der Methodenentwicklung auch einen höheren Untergrund im Vergleich zu anderen Massenspuren. Da es sich bei dem neu beschriebenen Fragment zudem um ein nicht regiomerspezifisches Bruchstück handelt (vermutlich eine Decarboxylierung, s. unter 6.1.1 auf Seite 55), wurde zur Quantifizierung das üblicherweise in der Literatur zur Bestimmung von IPG F_{2α} verwendete Fragment m/z 193 herangezogen. Dieses Fragment ergab die beste Signalstärke bei gleichzeitig geringem Untergrund und gilt als charakteristisches Markerfragment der Regiomerklasse des Zielanalyten IPG F_{2α} (s. unter 6.1 auf Seite 60).

Vorversuche zu einem potentiellen Einsatz des Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Moduls SelexION verliefen erfolgreich. Mit der Ausnahme von 15(R)-IPG F_{2α} konnten alle anderen verfügbaren Isomere erfolgreich von IPG F_{2α} nur durch die Anwendung der Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS) selektiert werden (s. unter 6.1.4 auf Seite 63). Aufgrund dieser Resultate wurde eine schnelle Chromatographie auf einer kurzen Säule unter alkalischen Bedingungen verwendet. Trotz der kurzen Laufzeit wurde eine ausreichende Trennung der beiden DMS-kritischen Isomere 15(R)-IPG F_{2α} und IPG F_{2α} erreicht (s. Abb. 6.7 auf Seite 66). Eine Ausblendung der Signale aller übrigen Isomere gelang durch die Verwendung des DMS-Moduls. Bereits in den ersten langen Messserien fielen jedoch instabile Retentionszeiten auf, welche die Methode für eine Routineanwendung untauglich machten (s. unter 6.4 auf Seite 70). Eine Änderung der chromatographischen Bedingungen zu sauren Fließmitteln konnte dieses Problem beheben und die Retentionszeiten unter Beibehaltung einer ausreichenden Trennung der kritischen Isomere dauerhaft stabilisieren (s. Abb. 6.14 auf Seite 71 bzw. unter 6.6 auf Seite 72).

In Vorüberlegungen zu einer Extraktion wurde die Möglichkeit von Abdampfverlusten des Zielanalyten IPG F_{2α} evaluiert, ein Thema über das in der verwendeten Literatur keine Angaben auffindbar waren. Aus saurer Lösung zeigten sich dabei Verluste von bis zu -48 % (s. Abb. 6.17 auf Seite 76), welche aber einfach kompensiert werden konnten (s. unter 6.7.1 auf Seite 75). Die endgültige Methode verwendete keine Extraktion und damit auch keinen Lösungsmittelwechsel nach einer Evaporation. Eine Aufkonzentrierung der Extrakte war aufgrund der für die Aufgabe ausreichenden Sensitivität des entwickelten Messverfahrens nicht nötig. Insofern konnte eine Evaporation als potentielle Quelle für Verluste durch eine einfache Aufarbeitung umgangen werden.

Da Festphasenextraktion (SPE) das Hauptextraktionsverfahren der verfügbaren Literatur war (s. Tab. 2.4 auf Seite 21 oder [42]), sollte eine SPE-Methode zur Bestimmung von IPG F_{2α} aus Urin erarbeitet werden. Hierzu wurden mehrere Verfahren (Umkehrphase und Mixed-Mode) entwickelt und in ihrer Effektivität miteinander verglichen (s. unter 6.7.5 auf Seite 84). In Realmatrix zeigte sich bei allen unterschiedlichen SPE-Protokollen eine hohe Ionensuppression von bis zu -62 % (s. unter 6.28 auf Seite 86). Aufgrund dieses Matrixeffektes bestanden Zweifel, ob mit diesem Extraktionsverfahren die in den Taucherproben vermuteten teilweise sehr geringen Konzentrationen von IPG F_{2α} zuverlässig bestimmbar wären.

Daher wurden andere Extraktionsmethoden in Betracht gezogen. Mit der Festphasen-unterstützten Flüssigextraktion (SLE) wurde eine einfache und schnelle Variante einer Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) als Alternative optimiert. Analog zu den SPE-Extraktionen zeigte sich auch in der SLE ein starker Suppressionseffekt von bis zu -62 % (s. unter 6.33 auf Seite 90) bei der Anwendung in Realmatrix. Obata [163] berichtet von einer unzureichenden Wiederfindung bei einer SLE-Extraktion, was mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen jedoch nicht bestätigt werden konnte. Das hier verwendete SLE Protokoll zeigte keine Extraktionsverluste, dafür deutliche Suppressionseffekte durch die Matrix (s. unter 6.8 auf Seite 87). Diese Matrixeffekte waren vergleichbar mit denen der getesteten SPE-Verfahren (s. unter 6.7.5 auf Seite 84), wobei dort jeweils noch eine leicht geringere Extraktionseffizienz erzielt wurde. Im Vergleich der Extraktionsverfahren war die optimierte SLE-Methode (s. Tab. 6.11 auf Seite 89) den getesteten SPE-Verfahren (s. Tab. 6.9 auf Seite 84) vorzuziehen. SLE war in der Probenvorbereitung schneller und einfacher durchführbar, dabei waren für einen vergleichbaren Aufreinigungseffekt der Matrix weniger unterschiedliche Reagenzien und potentiell fehleranfällige Arbeitsschritte nötig. Im Vergleich zur klassischen LLE war eine SLE durch die Verwendung von Kartuschen zwar teurer, aber auch schneller und einfacher durchführbar. Ein

wesentlicher Vorteil der SLE im Vergleich zu einer LLE war die Verhinderung von Emulsionsbildungen. Ferner erlaubte das Kartuschenformat der SLE prinzipiell die Verwendung von Pipettierrobotern zur Automatisierung der Extraktion.

Die getesteten Extraktionsverfahren waren als nahezu gleichwertig anzusehen. SPE und SLE wiesen jeweils sehr gute Extraktionsausbeuten auf, aber beide Methoden litten unter dem Nachteil starker Matrixeffekte. Daher bestanden Zweifel, ob mit den getesteten Extraktionsverfahren die in den Urinen von Tauchern erwarteten teilweise sehr geringen Konzentrationen von IPG F_{2α} zuverlässig bestimmbar wären. Nach der verfügbaren Literatur war der Einsatz großer Mengen Matrix (beispielsweise 1 mL) und eine teils deutliche Aufkonzentrierung der Extrakte bei der Analytik von Urin üblich (s. hierzu Tab. 2.3 auf Seite 20 und Tab. 2.4 auf Seite 21). Eine potentielle Aufkonzentrierung der über SLE oder SPE gewonnenen Urinextrakte erschien im vorliegenden Fall nicht möglich zu sein ohne die bereits vorhandenen ausgeprägten Suppressionseffekte noch weiter zu verstärken.

Die entwickelten SPE- und SLE-Extraktionen konnten die supprimierenden Matrixbestandteile aus Urinproben nicht entfernen. Dieses entspricht den Beobachtungen von Lambert [186], welcher beschreibt wie hydrophobe und supprimierend wirkende Matrixbestandteile bei einer SPE auf der Kartusche aufkonzentriert werden und zu Suppressionseffekten führen können. Laut Lambert ist eine Direktinjektion oder Verdünnung der Probe zur Messung besser geeignet, da die Matrixeffekte dabei gegenüber einer SPE reduziert werden [186]. Auch Bohnstedt et al. [70] beschreiben Extraktionsprobleme, in den dort durchgeführten Versuchen wirkte eine SPE eher als Aufkonzentrierung anstatt einer Aufreinigung.

Aufgrund dieser Informationen wurden Vorversuche mit einer Direktinjektion von Realurin durchgeführt, ein Verfahren welches abhängig von der Sensitivität der Methode und der für die gestellte Aufgabe benötigten Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze mit einem Verdünnungsschritt vor der Injektion erweitert werden konnte (Dilute & Shoot). Die bis hierher optimierte Methode wurde unter den neuen Voraussetzungen einer Direktinjektion von Matrix in Anlehnung an die bisherigen Parameter überarbeitet (s. zu den Veränderungen der Methode unter 5.9 auf Seite 48). Die Verwendung einer längeren analytischen Säule bewirkt eine längere Laufzeit, wird aber auch mit einer besseren Abtrennung von störenden Substanzen in Verbindung gebracht [123, 137]. Daher wurde die Retention zur besseren Abtrennung des Zielanalyten IPG F_{2α} von den supprimierenden Begleitsubstanzen erhöht. Hierzu wurde eine längere chromatographische Säule verwendet und die Temperatur abgesenkt. Ein langsamer Gradient hielt die Peaks trotz der längeren Säule und Laufzeit schmal. Zur Materialschonung wurde der Fließmittelzusatz reduziert, dieses sollte potentielle Stromüberschläge zwischen den Elektrodenplatten des SelexION-Moduls verhindern und zeigte in den Versuchen keine Veränderung der Peaks in Hinsicht auf Lage, Breite oder Form. In Erwartung von sehr geringen Signalen durch eine Direktinjektion oder sogar Verdünnung der Urine wurde die Sensitivität des Systems erhöht, indem der Curtain Gas-Wert (CUR) gesenkt wurde (s. unter 6.3 auf Seite 67).

Die mit der veränderten Methode an Realurinen durchgeführten Proof-of-Concept-Versuche zeigten, wie auch die Suppressionsversuche zur SPE und SLE-Extraktion mit Realmatrix (s. unter 6.7.5 auf Seite 84 bzw. 6.8.1 auf Seite 89), auf mehreren MRM-Spuren deutlichen Untergrund oder eine geringe Signalstärke für den Zielanalyten IPG F_{2α}. Daher wurde die Anzahl der MRM-Übergänge auf jeweils eine Massenspur für den Zielanalyten (m/z 353-193) und den internen Standard (m/z 357-197) reduziert und stattdessen die Dwell Time dieser Übergänge erhöht. Die Massenspur m/z 353-193 gilt als spezifisch für die Verbindungen des Regiomersubtypus des Zielanalyten IPG F_{2α} [123, 192] und zeigte die beste Signalstärke bei geringem Untergrund. Weitere MRM-Übergänge waren für die gestellte Aufgabe nicht hilfreich. Zusätzliche Signale werden unter den verwendeten Bedingungen vorwiegend durch Isomere verursacht, welche die gleichen Fragmente wie der Zielanalyt IPG F_{2α} bilden. Da keine selektiven Massenübergänge der einzelnen Isomere innerhalb eines Regiomersubtypus vorhanden waren, wurde eine Trennung durch ein anderes Verfahren als die Massenspektrometrie nötig, wie beispielsweise Chromatographie oder Differentielle Mobilitätsspektrometrie. Die Verwendung orthogonaler Trenntechniken bot das Potential einer größeren Selektivität als weitere nicht selektive

MRM-Spuren.

In der verfügbaren Literatur über Isoprostane finden sich nahezu keine quantitativen Methoden, welche auf eine klassische Extraktion verzichten, sondern die Matrix direkt oder nach einer Verdünnung injizieren. Lediglich bei Saenger et al. [102] wird eine solche Vorgehensweise beschrieben, dort wurden starke Matrixsuppressionseffekte beobachtet. In den Vorversuchen mit der veränderten Methode konnte auch ohne eine aufwändige Extraktion in jeder Urinprobe ein deutliches Signal von IPG $F_{2\alpha}$ gemessen werden, das war in dieser Form und Deutlichkeit vorher nicht möglich. Die einfache Aufarbeitung (Dilute & Shoot) wurde dabei mit einer längeren Analysendauer und möglicherweise schnelleren Abnutzung der analytischen Säule erkauft. Allerdings ist die Aufarbeitung von Proben der Teil einer Methode mit der höchsten Fehleranfälligkeit [211], weil gerade bei komplexen Extraktionen viele manuelle Schritte nötig sind und jeder davon zu Verlusten führen kann. Auch konnte durch die einfache Verdünnung der Proben das zur Messung nötige Matrixvolumen minimiert werden. Die in der verfügbaren Literatur beschriebenen Extraktionsverfahren benötigen oft 1 mL Urin oder mehr (s. hierzu Tab. 2.3 auf Seite 20 und Tab. 2.4 auf Seite 21), die hier zur Messung der Taucherproben verwendete Methode kommt mit einem minimalen Probenvolumen von 20 μ L aus.

Für die Selektivitätsmessungen wurden Urine mit teilweise extrem geringen Creatininwerten (s. Tab. 5.23 auf Seite 51) verwendet, auch in diesen Proben war immer ein deutliches Signal von IPG $F_{2\alpha}$ messbar. Dieses demonstrierte die Sensitivität des entwickelten Messverfahrens, es musste davon ausgegangen werden, dass der endogene IPG $F_{2\alpha}$ -Grundgehalt in jedem Urin messbar war und damit keine Real-Leermatrix verfügbar sein würde. Dieses erschwerte die Validierung, welche so weit möglich mit Realmatrix durchgeführt werden sollte.

b) komplexe biologische Matrix

Das Problem der durch die Matrix verursachten Suppression war nicht über eine Extraktion lösbar. Mehrere voneinander unabhängige und jeweils für Urin optimierte Extraktionsverfahren zeigten nahezu identische Ergebnisse: Trotz einer fast vollständigen Extraktionsausbeute lagen bereits bei nicht weiter aufkonzentrierten Extrakten stark ausgeprägte Suppressionseffekte vor (s. unter 7.1 auf Seite 124 bzw. 6.7.5 auf Seite 84 und 6.8.1 auf Seite 89).

Die Verwendung der differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS) konnte die Suppression nicht beeinflussen, da sich die Matrixeffekte in der Ionenquelle und daher vor dem SelexION-Modul auswirkten. Sowohl die Festphasenextraktion (SPE) wie auch eine Festphasen-unterstützte Flüssigextraktion (SLE) waren nicht in der Lage, die supprimierend wirkenden Matrixbestandteile effektiv zu entfernen. Insbesondere Mixed-Mode-SPE Aufarbeitungen sollten für Urin besonders saubere Extrakte ergeben und durch die starke Aufreinigung Ionensuppressionen verhindern [212]. Die Entwicklung einer weiteren Extraktions- und Aufreinigungsmethode zusätzlich zu SPE und SLE schien daher wenig zielführend. Die störenden Substanzen waren dem Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ in den physiko-chemischen Eigenschaften zu ähnlich um das Suppressionsproblem durch eine selektive Extraktion lösen zu können.

Eine einfach umsetzbare Option zur Minimierung der Suppression war eine Veränderung der Chromatographie, um die supprimierenden Matrixbestandteile vom Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ besser zu trennen (s. zu den Veränderungen der Methode unter 5.9 auf Seite 48 bzw. 7.1 auf Seite 124). Dazu musste die schnelle Chromatographie in ein Verfahren mit einer längeren Analysenzeit verändert werden. Alternativ hätte eine andere und für Suppressionseffekte weniger anfällige Ionisierungsmethode wie beispielsweise Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) verwendet werden können, allerdings wird in der verfügbaren Literatur von der Unwirksamkeit einer APCI-Ionisierung zur Kompensierung von Suppressionseffekten bezüglich Isoprostanen berichtet [102].

Matrixeffekte und Ionensuppression wurden als Achillesferse quantitativer LC-MS/MS-Methoden beschrieben und sollten dementsprechend sorgfältig im Rahmen einer Validierung geprüft werden [213]. Da nach der verwendeten Literatur Tauchen eine Urinverdünnung bewirkt [1], wurde primär von Proben mit einem geringen Creatiningehalt ausgegangen. In der verfügbaren Literatur wurde

in Ermangelung von Leermatrix die Ermittlung des Matrixeffektes teilweise mit synthetischem Urin durchgeführt [214], ein Ansatz welcher in der vorliegenden Arbeit abgelehnt wurde. Die Ergebnisse der durchgeführten Dilute & Shoot-Messungen zeigten, dass obwohl Kunsturin (Surine) und gering konzentrierte Realurine keinen nennenswerten Matrixeffekt ergaben, unphysiologisch hoch konzentrierte Urine durchaus Suppressionen von bis zu -43 % hervorrufen konnten (s. unter 6.10.5 auf Seite 107). Der Einsatz eines isotope markierten internen Standards konnte die Matrixeffekte jedoch effektiv kompensieren.

Die beobachteten Matrixeffekte wurden mit zunehmendem Creatiningehalt bzw. der Konzentration des Urins größer. Mit der Konzentration des Urins steigen die Mengen des Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ wie auch die der supprimierenden Substanzen an und es kam dadurch in der Ionenquelle zu Konkurrenzreaktionen. Selbst bei extrem (unphysiologisch hoch) konzentrierten Urinen war die Messung mit der vorliegenden Dilute & Shoot-Methode problemlos möglich (s. unter 6.10.5 auf Seite 107). Bei stärker supprimierend wirkenden Matrices wäre auch eine höhere Verdünnung eine Option gewesen: konzentrierte Urine zeigten zwar eine intensivere Suppression, aber dafür auch gleichzeitig ein stärkeres IPG $F_{2\alpha}$ -Signal und könnten daher auch weiter verdünnt werden.

In einem Vergleich der Dilute & Shoot-Prozedur mit den im Rahmen der Methodenentwicklung geprüften Extraktionsverfahren (SPE und SLE) zeigten die letzteren bereits bei normal konzentrierten Urinen einen höheren Matrixeffekt von -62 % (s. Tab. 6.28 auf Seite 86 bzw. Tab. 6.33 auf Seite 90). Die Extrakte waren hierbei nicht weiter aufkonzentriert, ein bei solchen Extraktionsverfahren üblicher Schritt, allerdings wurden die Suppressionsmessungen für SPE und SLE auf einer deutlich kürzeren analytischen Säule durchgeführt. Entgegen Angaben der Literatur über schwerwiegende Ionensuppressionen bei Dilute & Shoot-Verfahren [102, 214] war bei ausreichender Chromatographie und damit ausreichend geringem Matrixeffekt keine aufwändige und damit potentiell fehleranfällige Extraktion nötig, es reichte eine Direktinjektion oder einfache Verdünnung der Probe mit einer Lösung des internen Standards.

Während des Schreibens dieser Arbeit wurde ein Artikel von Liang et al. [215] veröffentlicht, in welchem zum ersten Mal eine IPG $F_{2\alpha}$ -Analytik mittels SelexION beschrieben wurde. Liang et al. [215] verwendeten eine sehr schnelle Methode fast ohne Chromatographie. Das Injektionsintervall von nur 1,5 Minuten wurde erreicht, indem auf eine chromatographische Säule verzichtet wurde, zur Verringerung der Peakdispersion wurde nur eine kurze Vorsäule benutzt. Obwohl im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit ein leistungsfähigeres Messgerät (eine Sciex QTRAP 6500) eingesetzt wurde, beschrieben die Autoren eine Bestimmungsgrenze von 10 ng/mL in Lösungsmittel und damit ohne Matrix. Dieser Messbereich wäre für die Analytik der zu messenden Taucherproben (ohne eine mögliche Aufkonzentrierung) um etwa den Faktor 1000 zu hoch angesetzt, ohne die Matrixsuppression aufgrund der fehlenden Chromatographie bei dieser Abschätzung berücksichtigen zu können.

Aufgrund von Matrixeffekten konnte die Methode von Liang et al. [215] nicht bei Realurinen angewendet werden. Trotz einer Probenaufarbeitung mittels Festphasenextraktion (SPE) oder Proteinfällung wurde die Signalintensität als schwach und die Peakform als abnormal beschrieben, wodurch eine Quantifizierung von IPG $F_{2\alpha}$ in den untersuchten Urinproben nicht möglich war. Dieses wurde von den Autoren auf starke Matrixeffekte zurückgeführt und daraus geschlossen, dass die Analytik von schwer trennbaren Substanzen aus biologischen Matrices eine gute Probenvorbereitung oder die Kombination mit einer Chromatographie benötigt.

c) Vielzahl an Isomeren

Es können theoretisch 128 mögliche Isomere der Isoprostane in vier verschiedenen Regiomerklassen (s. unter 2.5.3 auf Seite 10) gebildet werden. Die Regiomerkklasse des Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ besteht daher aus 32 isomeren Verbindungen.

Das Zusammenspiel unterschiedlicher Komponenten eines Messverfahrens kann zur Verbesserung der Selektivität bei der Analyse von Isoprostanen genutzt werden. Nach Zhang und Saku [171] können mittels MS/MS-Detektion die vier Klassen der Isoprostan-Regiomere unterschieden werden, da jede

Klasse charakteristische Fragmente erzeugt (s. Abb. 6.1 auf Seite 60). Über ein flüssigchromatographisches Verfahren hingegen können Stereoisomere voneinander separiert und getrennt erfasst werden [171]. Die Selektivität der vorliegenden Methode wurde aus der Kombination von drei Komponenten gebildet, welche bedingt durch ihre unterschiedlichen Prinzipien als zueinander orthogonal angesehen werden können:

1. Chromatographie (LC)
2. Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS) (s. hierzu Hypothese 2 unter 7.2 auf Seite 136)
3. Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Die schnelle und einfache Probenvorbereitung bestand aus nur einem Verdünnungsschritt (Dilute & Shoot) und war daher nicht selektiv. Die angewandte Umkehrphasen-Chromatographie trennte vorwiegend nach Polarität, das DMS-Modul steigerte die Selektivität über die Nutzung unterschiedlicher Molekülquerschnitte und der MS/MS-Detektor verwendete das Masse-Ladungs-Verhältnis von Vorläuferion vor und Produktion nach einer Fragmentierung.

Chromatographie (LC)

Bereits durch die verwendeten chromatographischen Bedingungen lagen fast alle verfügbaren Referenzsubstanzen getrennt zum Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ vor (s. Tab. 6.13 auf Seite 97). Nur bezüglich des Isomers IPG $F_{2\beta}$ wurde keine vollständige Basislinientrennung erreicht. Die Auflösung beider Substanzpeaks war eindeutig und gut genug, um als separate Signale erkannt und falls vorliegend entsprechend integriert werden zu können. In der zur Verfügung stehenden Literatur konnte das Isomer IPG $F_{2\beta}$ bisher nicht nachgewiesen oder identifiziert werden [70, 100, 101]. Bei den in Urinen neben dem Prostaglandin PG $F_{2\alpha}$ nachgewiesenen Verbindungen handelt es sich der Literatur nach um die Isomere IPG $F_{2\alpha}$, 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$, 15(R)-PG $F_{2\alpha}$ und 11 β -PG $F_{2\alpha}$ [175, 216–218]. In keinem der im Rahmen der Selektivitätsprüfung untersuchten Realurinen ($n = 20$) und in keiner Taucherprobe ($n = 234$) war ein Signal von IPG $F_{2\beta}$ erkennbar. Daher wurde davon ausgegangen, dass dieses Isomer nicht oder nur in einer Menge gebildet wird, die durch das Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Modul SelexION herausgefiltert werden konnte. Würde unter hyperbar-hyperoxischen Bedingungen die Bildung von IPG $F_{2\beta}$ in den zu untersuchenden Taucherproben verstärkt und die Selektivität durch das SelexION wäre nicht ausreichend, so hätte die vorhandene chromatographische Trennung dennoch eine selektive Quantifizierung des Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ ermöglicht.

Insbesondere das DMS-kritische Pärchen IPG $F_{2\alpha}$ und 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ lag unter den gewählten Bedingungen basisliniengetrennt vor. In jedem getesteten Taucherurin ($n = 234$) waren Signale von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ messbar. Dieses deutete darauf hin, dass dieses Isomer ebenfalls unter Bedingungen des oxidativen Stresses immer gebildet wurde. Da das Signal von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ jedoch chromatographisch deutlich abgetrennt vom Signal von IPG $F_{2\alpha}$ vorlag, störte es die Bestimmung des Zielanalyten nicht.

Eine Retentionszeitverschiebung, wie unter alkalischen Bedingungen beschrieben (s. unter 6.4 auf Seite 70), konnte nicht beobachtet werden. Unter den zur Validierung und später zur Messung der Taucherproben verwendeten Methodenparametern war die Retention stabil.

Die chromatographische Methode wurde bewusst lang gewählt, dieses war nötig um Suppressionseffekte durch die Matrix Urin zu vermeiden (s. unter 7.1 auf Seite 124 und 7.1 auf Seite 127). Eine Kürzung der Säule und damit der Laufzeit scheint unter Verwendung von kleineren Partikeln mit höherer Trennleistung denkbar. Eine andere Option besteht in der Wahl einer anderen stationären Phase mit einer alternativen Selektivität. Diese muss dazu in der Lage sein, die supprimierend wirkenden Matrixbestandteile entsprechend effektiv vom Zielanalyten abtrennen zu können.

Gemäß der Methodenbeschreibung von Liang et al. [215] sollte eine durch Matrixeffekte verursachte schlechte Sensitivität durch eine Festphasenextraktion (SPE) mit folgender Aufkonzentrierung kompensiert werden. Auch hier kommen die Autoren zu dem Schluss, dass eine längere Chromatographie ein für diesen Fall vorteilhafter Weg wäre, um die Suppressionseffekte zu minimieren.

Die hier zur Messung der Taucherproben verwendete Methode war aufgrund der guten chromatographischen Trennung auch ohne die zusätzliche Verwendung eines DMS-Moduls anwendbar (s. unter 6.13 auf Seite 121 bzw. 7.2 auf Seite 136).

Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Die MS/MS-Detektion konnte durch Verwendung eines charakteristischen MRM-Übergangs den Regiomersubtypus (15-Serie) des Zielanalyten IPG F_{2α} selektiv von den anderen drei Regiomerklassen erfassen. Jede dieser Regiomerklassen beinhaltet dabei insgesamt 32 isomere Isoprostane (s. unter 2.5.3 auf Seite 10). Gleichzeitig wurde der Untergrund durch das Tandem-MS-Verfahren deutlich reduziert und erst dadurch eine für die gestellte Aufgabe nötige Grundsensitivität erreicht. In Kombination mit der Chromatographie war das Verfahren so sensitiv, dass eine klassische Probenvorbereitung unnötig wurde und auf eine einfache Verdünnung der Matrix Urin mit einer Lösung des internen Standards reduziert werden konnte.

Nach Zhang und Saku [171] ist mittels MS/MS eine Unterscheidung der Isoprostan-Regiomere aufgrund von charakteristischen Fragmenten möglich (s. Abb. 6.1 auf Seite 60). Die Selektion der Regiomere gelingt dabei nicht vollständig, der üblicherweise zur Messung verwendete charakteristische Übergang von IPG F_{2α} (m/z 353-193) kommt sowohl in der 15-Serie des Zielanalyten, wie auch der 5-Serie vor [65, 169]. In den Messungen von Li et al. [169] ergab sich eine 10 %ige Überschneidung der Signalintensität, das Produktion m/z 193 gilt dennoch als spezifisch für die 15-Serie des Zielanalyten IPG F_{2α} [158, 171]. Aufgrund der deutlich unterschiedlichen Strukturen liegt in der Praxis üblicherweise eine ausreichende chromatographische Trennung zwischen den Verbindungen der verschiedenen Regiomerklassen vor, so dass der Einfluss der Isomere der 5-Serie auf die Messung des Zielanalyten IPG F_{2α} vernachlässigbar ist. Eine Beeinträchtigung der Messergebnisse durch Regiomere der 5-Serie erscheint aufgrund der verwendeten langen Chromatographie wenig wahrscheinlich, konnte aber aufgrund nicht vorhandener Standards nicht geprüft werden. Neben der chromatographischen Trennung kam das SelexION als zusätzliche Selektivitätsdimension zur Anwendung. Für eine nicht erkannte Interferenz müsste eine komplette Überlagerung von Substanzen aus der 5-Serie mit dem Zielpeak bei entsprechend hoher Transmissionsrate durch das DMS-Modul vorliegen. In den IPG F_{2α}-Signalen aller im Rahmen dieser Arbeit gemessener Proben konnten keine Hinweise auf Störungen durch andere Isomere gefunden werden.

Über die Massenspektrometrie war zwar eine Separation von anderen Matrixkomponenten und Regiomerern möglich, nicht aber zwischen den 32 Stereoisomeren der 15-Serie selbst, welche alle ein qualitativ identisches Massenspektrum aufwiesen (s. unter 6.1.1 auf Seite 55). Das Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Modul SelexION hingegen konnte alle Prostaglandine und auch viele Isoprostane der 15-Serie komplett ausblenden (s. unter 7.2 auf Seite 136). Daher war lediglich eine chromatographische Trennung zwischen IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} nötig, da diese beiden Isomere durch die Kombination aus den Selektivitätsdimensionen DMS und MS/MS nicht getrennt werden konnten.

Der verwendete Massendetektor bot die Möglichkeit einer MS³-Messung (= MS/MS/MS). Diese Option der doppelten Fragmentierung wird üblicherweise zu einer verbesserten Untergrundreduktion und damit Erhöhung der Sensitivität eingesetzt. Trotz der geringen Molekülmasse war MS³ auch bei IPG F_{2α} anwendbar. Da durch die Verwendung des DMS-Moduls SelexION allerdings nahezu kein Untergrund mehr vorhanden war, wurde diese Option nicht weiter verfolgt. Eine MS³-Messung bewirkt deutliche Intensitätsverluste, und es war keine weitere Steigerung der Selektivität zu erwarten, da alle 32 Isoprostane der 15-Serie die gleichen MS³-Fragmente erzeugten.

7.1.1. Bestimmung von IPG $F_{2\alpha}$ in Urinen von Tauchern vor und nach einem Tauchgang

Unter hyperbar-hyperoxischen Bedingungen, wie beim Tauchen, liegt mehr Sauerstoff im Plasma gelöst vor als im physiologischen Zustand (s. unter 2.4 auf Seite 6). Die Auswirkungen einer erhöhten Sauerstofflast auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und daraus folgend oxidativem Stress wird in der verfügbaren Literatur kontrovers diskutiert. Untersuchungen zum Effekt von Training unter hyperbaren Bedingungen ergaben beispielsweise keine Hinweise auf eine Erhöhung von Markern des oxidativen Stresses bei Fußballspielern in Bezug auf die untersuchten Parameter [219]. Bei normobar hyperoxisch behandelten Patienten hingegen wurde ein signifikanter Anstieg des oxidativen Stresses beobachtet [220], bei Untersuchungen mit einer hyperbaren Sauerstofftherapie (HBO) waren keine messbaren Veränderungen erkennbar [221]. Keiner der genannten Artikel hat dabei Isoprostane aus Urin untersucht, es wurden jeweils andere Parameter verwendet.

Auch Taucher zeigten in Studien unter normobar hyperoxischen Bedingungen in Bezug auf die verwendeten Parameter einer Lipidperoxidation keinen erhöhten oxidativen Stress [222], auch in dieser Studie wurden keine Isoprostane gemessen. In der verfügbaren Literatur gibt es Hinweise auf mögliche Adaptionseffekte des Körpers von Tauchern an die größere Verfügbarkeit von Sauerstoff [223], welche in einer Reduktion von Markern des oxidativen Stresses resultieren. Ähnliche Adaptionseffekte im Zusammenhang mit oxidativem Stress werden bei Triathleten nach chronischem Training beschrieben [38], wobei der Grund hier in einer Up-Regulation des endogenen antioxidativen Systems gesehen wird [224].

Bestimmung von Creatinin zur Normierung der Messwerte

Creatinin ist ein aus der Muskelzelle stammendes Abbauprodukt von Creatin. Die Tagesausscheidung von Creatinin korreliert mit der Muskelmasse und ist bei Erwachsenen unter physiologischen Bedingungen relativ konstant. Daher kann die Creatininkonzentration im Urin als ein Maß für die Urinkonzentration betrachtet werden. Große Urinvolumina führen bei derselben Testperson zu geringeren Urin-Creatininkonzentrationen, geringe Urinvolumina hingegen zu hohen Creatininkonzentrationen. Urine unterliegen bezüglich der Creatininkonzentration physiologisch einer außerordentlich großen intra- und interindividuellen Schwankungsbreite mit einem bei Männern häufig verwendeten Normbereich von 390-2590 mg/L. [203]

Arndt [204] konnte in einer retrospektiven Auswertung von 45.000 Urinproben zeigen, dass Creatinin-Messwerte in der Praxis oft von üblichen Normalwert-Angaben abweichen und schlägt für Männer einen veränderten Normbereich von 256-2660 mg/L vor.

Bezogen auf den Median aller gemessenen Urine ($n = 234$) waren die Creatininwerte der Proben vor einem Tauchgang um +22 % konzentrierter (s. Tab. 6.23 auf Seite 113). Direkt nach den Tauchgängen sank die Konzentration der Urine um -34 % ab und normalisierte sich nach sechs Stunden auf +10 % des Medians aller Urine. Dieses entspricht den Angaben der verfügbaren Literatur, Tauchen bewirkt eine Urinverdünnung [1]. Daher waren direkt nach einem Tauchgang niedrigere Creatininwerte im Urin zu erwarten als zu den anderen Messpunkten oder im Vergleich zu den Normbereichsangaben.

Bestimmung von IPG $F_{2\alpha}$ als Marker des oxidativen Stresses

Direkt nach einem Tauchgang waren die auf Creatinin normierten Messwerte von IPG $F_{2\alpha}$ im Vergleich zum Ausgangswert vorher signifikant um +6 % (Median) erhöht (Mittel +10 %) (s. Tab. 6.25 auf Seite 116 bzw. Tab. 7.1 auf der nächsten Seite). Nach sechs Stunden sanken die Werte unterhalb des Ausgangsniveaus vor dem Tauchgang um -11 % (Median) ab (Mittel -9 %) (s. Tab. 6.25 auf Seite 116).

Tab. 7.1.: Zusammenfassung der Veränderung von IPG $F_{2\alpha}$ und 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ bezogen auf Creatinin direkt nach einem Tauchgang im Vergleich zu den Ausgangswerten davor ($n = 78$)

Parameter	Veränderung [%]	Veränderung [%]	Signifikanz
	Mittelwert	Median	
IPG $F_{2\alpha}$	+10,3	+5,9	$p = 0,0017$ (**)
15(R)-IPG $F_{2\alpha}$	+4,2	+1,4	$p = 0,4647$ (ns)

Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein gepaarter ANOVA-Test mit einem Mehrfachvergleich nach Tukey ($p = 0,05$) verwendet. Der post-hoc Test nach Tukey gilt als eher konservative Methode der Berechnung und besonders für paarweise Vergleiche geeignet [225].

Die untersuchten Proben stammten aus insgesamt 78 Tauchgängen, bei jedem Tauchgang wurde ein Set bestehend aus jeweils drei Urinproben (vor und nach dem Tauchgang, sowie sechs Stunden später) genommen ($n = 234$). Bezogen auf die Werte von IPG $F_{2\alpha}$ vor dem Tauchgang zeigte sich in 62 % der Proben eine Steigerung durch die körperliche Belastung unter hyperbar-hyperoxischen Bedingungen (s. Tab. 7.2), in 27 % dieser Fälle lag die Steigerung bei mehr als 20 %. In 38 % der Tauchgänge konnte jedoch kein Anstieg der Messwerte bezogen auf Creatinin festgestellt werden, es lagen bezüglich der verwendeten Bedingungen Nonresponder vor.

Tab. 7.2.: Zusammenfassung der Klassifizierung der Messwertveränderungen von IPG $F_{2\alpha}$ und 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ bezogen auf Creatinin nach einem Tauchgang

Parameter	Wirkung		Klassifikation		
IPG F _{2α}	62 %	Responder	Klasse	Anzahl	%
			> 20 % Steigerung	21	27
	38 %	Nonresponder	10-20 % Steigerung	12	15
			0-10 % Steigerung	15	19
			kein Anstieg	30	38
15(R)-IPG F _{2α}	53 %	Responder	Klasse	Anzahl	%
			> 20 % Steigerung	14	18
	47 %	Nonresponder	10-20 % Steigerung	12	15
			0-10 % Steigerung	15	19
			kein Anstieg	37	47

Ausgehend von Hypothese 1 (s. unter 3.1 auf Seite 25) wurde von einem generellen Anstieg der Messwerte ausgegangen, daher ist die Robustheit von IPG $F_{2\alpha}$ als Marker für eine erhöhte Sauerstofflast bei Tauchern als eingeschränkt zu bewerten. Möglicherweise lag bei den trainierten Berufstauchern ein in der Literatur beschriebener Adaptionseffekt an die Sauerstoffbelastung durch Tauchgänge vor [223] und daher fallen die Steigerungen sehr unterschiedlich aus oder konnten teilweise sogar gar nicht festgestellt werden. Die Tauchübungen werden meist abends oder bei Nacht durchgeführt, also repräsentiert der IPG $F_{2\alpha}$ -Wert vor dem jeweiligen Tauchgang den oxidativen Stresslevel des jeweiligen Tages bzw. der Stunden vor dem Tauchgang. Falls in dieser Zeit ein erhöhtes Niveau an oxidativem Stress bestand (z. B. durch Sport oder andere anstrengende Tätigkeiten etc.), wäre schon der Ausgangswert vor dem Tauchgang sehr hoch gewesen. Ein Anstieg der IPG $F_{2\alpha}$ -Werte durch die Sauerstoffbelastung des Tauchgangs würde dadurch verzerrt und möglicherweise kleiner

erscheinen als bei einem Taucher, der vor dem Tauchgang weniger oxidativem Stress ausgesetzt war. Dieses könnte auch erklären warum es bei den Proben im Durchschnitt zu einem Absinken der Werte sechs Stunden nach einem Tauchgang unterhalb der Ausgangsbedingungen vorher kam. Abhängig von der für eine aus dem Blutkreislauf in den Urin nötigen Eliminationszeit kann eine Aussage nur über einen gewissen Zeitraum getroffen werden. Zur Abschätzung des Nachweisfensters eines Xenobiotikums in Urin wird üblicherweise ein Faktor von 6-10 auf die Halbwertszeit verwendet. Bei einer Eliminationshalbwertszeit der Isoprostane von 16 Minuten (s. unter 2.5.6 auf Seite 13) ergibt sich damit eine Zeitspanne von bis zu 160 Minuten, über welche der Zielanalyt kontinuierlich in den Urin ausgeschüttet wird. Abhängig vom Zeitpunkt des letzten Toilettengangs ist die Messung von IPG $F_{2\alpha}$ aus Urin als Summenparameter des oxidativen Stresses zu betrachten, da der Urin in der Blase gesammelt und die Biomarker somit konserviert werden.

Unter hyperbar-hyperoxischen Bedingungen, wie sie beim Tauchen vorliegen, sollten theoretisch verstärkt Isofurane anstelle von Isoprostanen gebildet werden (s. unter 7.3 auf Seite 154). Es ist nicht bekannt oder bei Tauchern untersucht worden, ob die möglichen Isoprostan-Nonresponder eine besonders starke Produktion von Isofuranen zeigen und der Organismus somit lediglich auf einen anderen metabolischen Weg ausgewichen ist. Dieses könnte Teil des Adaptionseffektes von Tauchern an erhöhte Sauerstoffbelastungen sein [223], da mit Hilfe von Isofuranen mehr Sauerstoffmoleküle als mit Isoprostanen gebunden und metabolisiert werden können (s. unter 7.3 auf Seite 154). Gleichzeitig könnte das den Anteil von 38 % Nonrespondern erklären oder warum die Steigerung von IPG $F_{2\alpha}$ bezogen auf Creatinin im Vergleich zu anderen Markern des oxidativen Stresses geringer ausgefallen ist (s. hierzu unter 7.3 auf Seite 149 bzw. unter 7.3 auf Seite 151).

Ein möglicher Einfluss des Individuums auf die Ergebnisse konnte nicht überprüft werden. Die Proben lagen derart anonymisiert vor, dass keine Rückschlüsse auf einen individuellen Taucher in Bezug auf mehrere Tauchgänge gemacht werden konnten. Somit konnten beispielsweise Tauchgänge mit unterschiedlichen Sauerstoffbelastungen nicht individuell für einen bestimmten Taucher miteinander verglichen und die Ergebnisse mit den Belastungen korreliert werden.

Die beschriebenen Veränderungen der IPG $F_{2\alpha}$ -Messwerte waren statistisch signifikant und konnten mit der verwendeten Methode im Rahmen der Präzision und Genauigkeit sicher bestimmt werden. Betrachtet man die Werte sechs Stunden nach einem Tauchgang als Basallevel, dann zeigte sich summarisch eine Steigerung von IPG $F_{2\alpha}$ als Marker des oxidativen Stresses im Median um +17 % (Mittel +19 %).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine Korrelation der prozentualen Veränderung der IPG $F_{2\alpha}$ -Werte bezogen auf Creatinin mit der Sauerstoffbelastung durch die jeweiligen Tauchgänge durchgeführt (s. unter 6.11.3 auf Seite 116). Dabei zeigte sich ein signifikant linearer Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,4214$ (s. Abb. 6.58 auf Seite 117). Daher kann die Varianz der Ergebnisse und somit die Veränderung der IPG $F_{2\alpha}$ -Werte pro Creatinin direkt nach einem Tauchgang zu 42 % durch die Sauerstoffbelastung erklärt werden [226]. Wird die Unpräzision der IPG $F_{2\alpha}$ -Messungen von maximal 13 % (s. unter 6.10.4 auf Seite 106) und die Unpräzision der Creatininbestimmung von maximal 5 % sowie die biologische Variabilität des Individuums bezüglich Isoprostane von bis zu 30 % [79] berücksichtigt, lassen sich insgesamt 90 % der Messwertanstiege erklären. Es bleiben nur 10 % der Einflussfaktoren auf die Veränderung der IPG $F_{2\alpha}$ -Werte pro Creatinin unbekannt.

Bestimmung von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ als potentieller alternativer Biomarker

Das Isomer 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ war neben dem Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ die einzige der geprüften Referenzsubstanzen, welche bei den verwendeten Einstellungen durch das Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Modul SelexION nicht ausgeblendet wurde (s. unter 6.10.2 auf Seite 96 bzw. 7.2 auf Seite 136), aber dafür chromatographisch getrennt vorlag. Ein Signal von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ war neben IPG $F_{2\alpha}$ in jeder Probe ($n = 234$) messbar. Dieses entspricht den Beobachtungen von Bohnstedt et al. [70], in den dort beschriebenen Untersuchungen wurden in allen Urinproben die Isomere IPG $F_{2\alpha}$,

15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ und PG $F_{2\alpha}$ gefunden. Damit war das Isomer 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ potentiell ebenfalls als Marker des oxidativen Stresses geeignet und wurde retrospektiv daraufhin ausgewertet (s. unter 6.12 auf Seite 118).

Die Veränderungen in Mittelwert und Median von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ (s. Tab. 6.27 auf Seite 120 bzw. Tab. 7.1 auf Seite 132) waren weniger stark ausgeprägt als bei IPG $F_{2\alpha}$ (s. Tab. 6.25 auf Seite 116 bzw. Tab. 7.1 auf Seite 132). Direkt nach dem Tauchgang waren die auf Creatinin normierten Messwerte von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ im Vergleich zum Ausgangswert im Median um +1 % erhöht (Mittel + 4%, s. Tab. 6.27 auf Seite 120 bzw. Tab. 7.1 auf Seite 132). Diese Steigerung war deutlich geringer als bei IPG $F_{2\alpha}$ (Erhöhung Median +6 %, Mittelwert +10 %, s. Tab. 6.25 auf Seite 116 bzw. Tab. 7.1 auf Seite 132). Nach einer Zeitspanne von sechs Stunden sanken die Werte ab, auch bei 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ nicht auf das Ausgangsniveau, sondern im Median um -8 % darunter (Mittel -1 %). In 53 % der Tauchgänge kam es bei 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ bezogen auf Creatinin zu einem Anstieg der Messwerte direkt nach dem Tauchgang (62 % bei IPG $F_{2\alpha}$), in 18 % dieser Fälle lag die Steigerung bei mehr als 20 % (27 % bei IPG $F_{2\alpha}$, s. Tab. 7.2 auf Seite 132).

Die beschriebenen Veränderungen der Werte von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ waren statistisch nicht signifikant. Das Isomer 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ war in dieser Hinsicht als ein weniger sensibler Marker des oxidativen Stresses zu werten. Unter identischen Bedingungen fiel die Steigerung der auf Creatinin normierten Ergebnisse in Mittelwert und Median bei IPG $F_{2\alpha}$ deutlich stärker aus (s. Tab. 7.1 auf Seite 132). Sieht man die Werte nach sechs Stunden als Basallevel an, dann zeigte sich summarisch eine Steigerung von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ als Marker des oxidativen Stresses im Median um + 9 % (Mittel +5 %). Auch unter dieser Annahme wäre 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ ein weniger sensibler Marker als IPG $F_{2\alpha}$ (Steigerung Median +17 %, Mittel +19 %). Das entspricht den Angaben der Literatur, Bohnstedt et al. [70] konnte bei Alzheimer-Patienten einen Anstieg der IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen um +12 % zeigen, bei 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ ergab sich nur eine Veränderung um +1 %. Auch hier war IPG $F_{2\alpha}$ als Marker des oxidativen Stresses besser geeignet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine Korrelation der prozentualen Veränderung der 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Werte bezogen auf Creatinin mit der Sauerstoffbelastung durch die jeweiligen Tauchgänge durchgeführt (s. unter 6.12.1 auf Seite 120). Im Vergleich zu IPG $F_{2\alpha}$ entsprachen weniger Proben der Erwartung von Hypothese 1 (s. Tab. 6.26 auf Seite 117 und Tab. 6.28 auf Seite 120 bzw. Tab. 7.2 auf Seite 132) und zeigten einen Anstieg von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ nach einem Tauchgang. Die Korrelation der prozentualen Veränderung der 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Ergebnisse pro Creatinin zeigte eine signifikant lineare Regression zur Sauerstoffbelastung der Taucher mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,3537$ (s. Abb. 6.62 auf Seite 121). Daher kann die Varianz der Ergebnisse und somit die Veränderung der 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Werte pro Creatinin nach einem Tauchgang zu 35 % durch die Sauerstoffbelastung erklärt werden [226]. Wird die Unpräzision der IPG $F_{2\alpha}$ -Messungen von maximal 13 % (s. unter 6.10.4 auf Seite 106) und die Unpräzision der Creatininbestimmung von maximal 5 % sowie die biologische Variabilität des Individuums bezüglich Isoprostane von bis zu 30 % [79] berücksichtigt, lassen sich 83 % der Messwertanstiege erklären. Es bleiben 17 % der Einflussfaktoren auf die Veränderung der 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Werte pro Creatinin unbekannt.

7.1.2. Fazit zu Hypothese 1

Zur Prüfung von Hypothese 1 war die Entwicklung und Validierung einer geeigneten Messmethode für die komplexe Matrix Urin nötig. Dabei wurden die Punkte Sensitivität bzw. Extraktion (s. unter 7.1 auf Seite 124), Matrixeffekt (s. unter 7.1 auf Seite 127) und Selektivität (s. unter 7.1 auf Seite 128) als besonders wichtig angesehen.

Erste Probleme der Methodenentwicklung ergaben sich mit instabilen Retentionszeiten durch die Verwendung eines alkalischen Fließmittels. Eine Veränderung der chromatographischen Bedingungen auf einen Säurezusatz konnte die Retention dauerhaft stabilisieren. Aufgrund der für IPG $F_{2\alpha}$ angestrebten niedrigen Bestimmungsgrenze von 25 pg/mL sollte ein Extraktionsverfahren entwickelt werden, welches eine Aufkonzentrierung der Messlösung ermöglicht und interferierende und

suppressierende Bestandteile der Matrix effektiv entfernt. Die Wahl fiel hierbei aufgrund der Literaturrecherchen auf Festphasenextraktion (SPE). Mehrere speziell für Urin entwickelte SPE-Verfahren zeigten in der Prüfung mit Realmatrix eine gute Extraktionsausbeute, aber einen stark ausgeprägten Matrixeffekt. Dieser Suppressionseffekt trat bereits bei nicht aufkonzentrierten Extrakten auf. Auch speziell zur Entfernung suppressierender Matrixbestandteile gedachte SPE-Verfahren zeigten keine Verbesserung der Suppression. Als Alternativverfahren wurde eine Festphasen-unterstützte Flüssigextraktion (SLE) entwickelt, auch diese ergab einen stark ausgeprägten Matrixeffekt trotz hoher Extraktionsausbeute.

Da die suppressierenden Matrixbestandteile nicht durch eine selektive Extraktion entfernt werden konnten, war eine zuverlässige Messung von Urinproben so nicht möglich. Zur Verringerung der Matrixeffekte wurde die Chromatographie verändert, um die suppressierend wirkenden Urinbestandteile vom Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ besser abzutrennen. Es zeigte sich, dass unter diesen neuen chromatographischen Bedingungen keine durch viele Schritte fehleranfällige Extraktion nötig war. Die Messung von Urinproben konnte mittels einer direkten Injektion nach Verdünnung durch Zugabe einer Lösung des internen Standards erfolgen. In der durchgeführten Validierung konnte diese Dilute & Shoot-Methode bezüglich Stabilität, Selektivität, Linearität, Präzision, Richtigkeit, Grenzwerte der Methode und Verschleppung überzeugen (s. unter 6.10 auf Seite 95).

Das entwickelte und validierte Messverfahren wurde zur Bestimmung von IPG $F_{2\alpha}$ aus Proben von Tauchern verwendet. Hierbei zeigte IPG $F_{2\alpha}$ bezogen auf Creatinin direkt nach einem Tauchgang signifikant höhere Werte als vorher (s. Tab. 7.1 auf Seite 132). Gleichzeitig konnte der Anstieg der Messwerte nach einem Tauchgang erstmals mit der Sauerstoffbelastung durch die Tauchgänge korreliert werden. Diese Korrelation zeigte einen signifikant linearen Zusammenhang auf. Beides untermauert die in Hypothese 1 aufgestellte Vermutung und zeigt einen Zusammenhang zwischen dem durch einen Tauchgang verursachten oxidativen Stress und dadurch erhöhten Werten von IPG $F_{2\alpha}$.

Zusätzlich wurde das Isomer 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ als Marker für oxidativen Stress evaluiert. Der Anstieg der Messwerte pro Creatinin war bei 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ nicht signifikant (s. Tab. 7.1 auf Seite 132). Dieses Isomer zeigte im Vergleich zu IPG $F_{2\alpha}$ mehr Schwankungen in den Messungen (s. Tab. 6.25 auf Seite 116 und Tab. 6.27 auf Seite 120) und weniger Proben entsprechen der Hypothese 1 (s. Tab. 7.2 auf Seite 132). Daher ist das Isomer IPG $F_{2\alpha}$ insgesamt als ein robusterer Parameter anzusehen und besser zur Bestimmung des oxidativen Stresses geeignet.

7.2. Hypothese 2

Mittels Differentieller Mobilitätsspektrometrie kann IPG $F_{2\alpha}$ selektiv von isobaren Verbindungen gemessen werden.

Im Vergleich zu LC-MS/MS-Messungen wird dabei der Untergrund verringert und folglich verbessert sich das Signal-Rausch-Verhältnis der Messmethode.

Bei den Isoprostanen handelt es sich um eine Gruppe von 128 isomeren Verbindungen, welche aufgrund des Bildungsmechanismus und der daraus resultierenden unterschiedlichen Strukturen in vier Regiomerklassen eingeteilt werden (s. unter 2.5.3 auf Seite 10). Aufgrund von regiomerspezifischen Fragmenten (s. Abb. 6.1 auf Seite 60) konnten die zu trennenden Verbindungen mit Hilfe der MS/MS-Detektion auf die 32 Isomere der Regiomerklasse des Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ eingeschränkt werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Methode mit einer möglichst hohen Selektivität des Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ zu den zahlreichen potentiell möglichen Isoprostan-Isomeren (s. unter 3.2 auf Seite 28).

Isoprostane unterscheiden sich von ihren isomeren Prostaglandinen durch nur geringe molekulare Unterschiede (s. Abb. 7.1). Diese kleinen Änderungen der Molekülgeometrie lassen sich durch die Anwendung der Differentiellen Mobilitätsspektrometrie nutzen, um die Selektivität der Messmethode zu erhöhen (s. unter 2.7 auf Seite 21). Beispielsweise unterscheiden sich die beiden Epimere IPG $F_{2\alpha}$ und PG $F_{2\alpha}$ lediglich in Position 8 und damit der Ausrichtung der Ketten zum Prostanring: cis beim Isoprostan, hingegen trans beim Prostaglandin. Als Folge daraus ergibt sich ein anderer dreidimensionaler Querschnitt des Moleküls, da die Seitenketten bezogen auf den Ring entweder parallel (cis) ausgerichtet oder aufgespreizt (trans) vorliegen (s. Abb. 7.1).

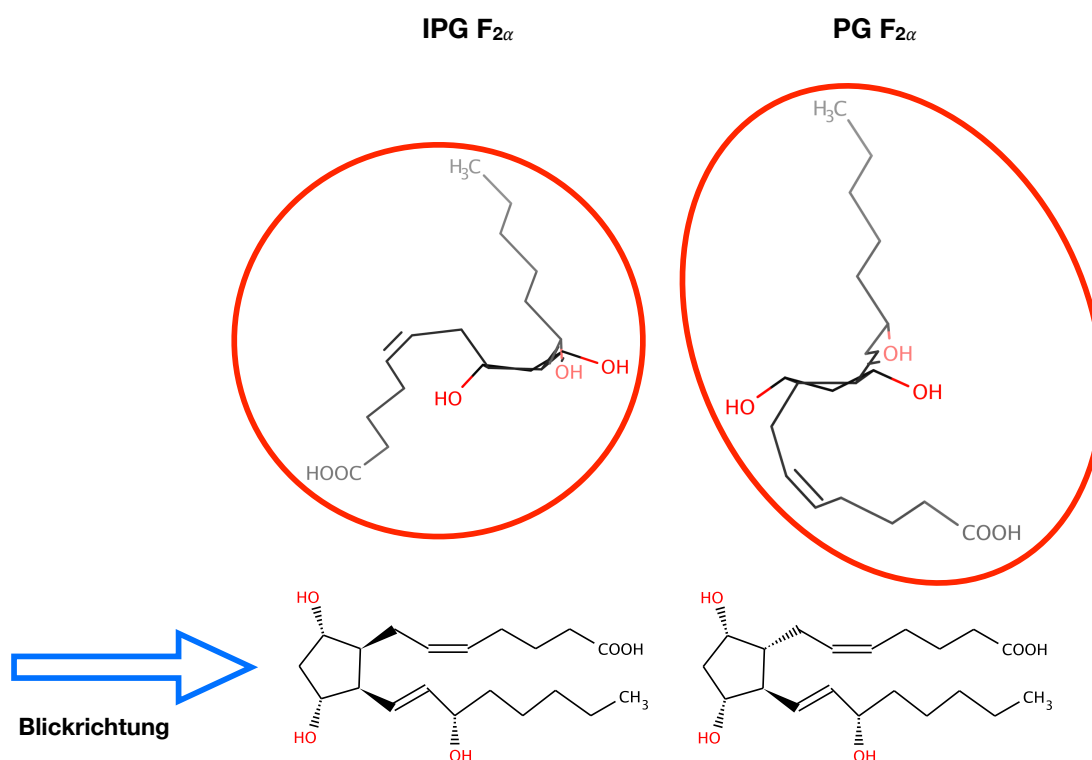


Abb. 7.1.: Darstellung der Strukturformeln von IPG $F_{2\alpha}$ und PG $F_{2\alpha}$; oben: 3D-Darstellung mit Blick auf Höhe der Ringebene vom Prostanring ausgehend (blauer Pfeil), der Molekülquerschnitt ist durch einen roten Kreis angedeutet; unten: zugehörige Strukturformeln von IPG $F_{2\alpha}$ und PG $F_{2\alpha}$.

Dieser geringe Unterschied führte zu einer Veränderung der Ionenmobilität und bot dadurch die Möglichkeit zur Anwendung der Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS). Die entsprechenden Versuche ergaben für die verfügbaren Referenzsubstanzen mit Ausnahme des deuterierten internen Standards Unterschiede in den optimalen DMS-Einstellungen im Vergleich zum Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ (s. Tab. 6.3 auf Seite 65 sowie unter 6.6 auf Seite 72 bzw. 6.10.2 auf Seite 96). Dieses zeigte, dass das SelexION-Modul tatsächlich zur Erhöhung der Selektivität in einer Isoprostananalytik geeignet war, vor allem die Ausrichtung der Seitenketten schien dabei das DMS-Verhalten der getesteten Substanzen zu bestimmen. Lediglich die beiden Isomere IPG $F_{2\alpha}$ und 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ zeigten ein sehr ähnliches Verhalten in der DMS-Zelle, diese Substanzen wurden daher als „DMS-kritisch“ angesehen. Eine Trennung dieser beiden Isoprostane war über das Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Modul SelexION aufgrund der geringen Unterschiede nicht möglich, hier musste eine chromatographische Trennung erfolgen.

Das Ziel einer DMS-Optimierung kann ein möglichst starkes Signal oder eine möglichst gute Trennung von beispielsweise isobaren Substanzen sein. Unter Umständen muss hier eine Abwägung der Optimierungsoptionen erfolgen und Signalstärke zu Gunsten von Selektivität geopfert werden.

Abbildung 7.2 zeigt die Lage der Kompensationsspannungen (COV) aller eingesetzten Referenzsubstanzen. Es ist erkennbar, dass der Zielanalyt IPG $F_{2\alpha}$ (in der Abbildung dunkelblau) und das Isomer 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ (in der Abbildung rot) einen deutlich geringeren Wert von ca. 8-8,5 V aufwiesen als die übrigen Analyte, deren Maxima zwischen 10-13 V lagen. Im Optimum der jeweiligen Kompensationsspannungen wurde die jeweils höchste Transmission dieses Isomers durch die DMS-Zelle erreicht. Dabei ergaben sich bezüglich IPG $F_{2\alpha}$ mit den anderen Analyten Überschneidungen (in der Abbildung als hellblauer Bereich markiert) von unterschiedlichem Ausmaß, insbesondere jedoch mit 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$. Das Optimum der Kompensationsspannung dieses Isomers lag nur knapp neben demjenigen der Zielsubstanz IPG $F_{2\alpha}$. Bei den übrigen Referenzsubstanzen gab es entweder keine oder nur geringe Überschneidungen (s. Abb. 7.2).

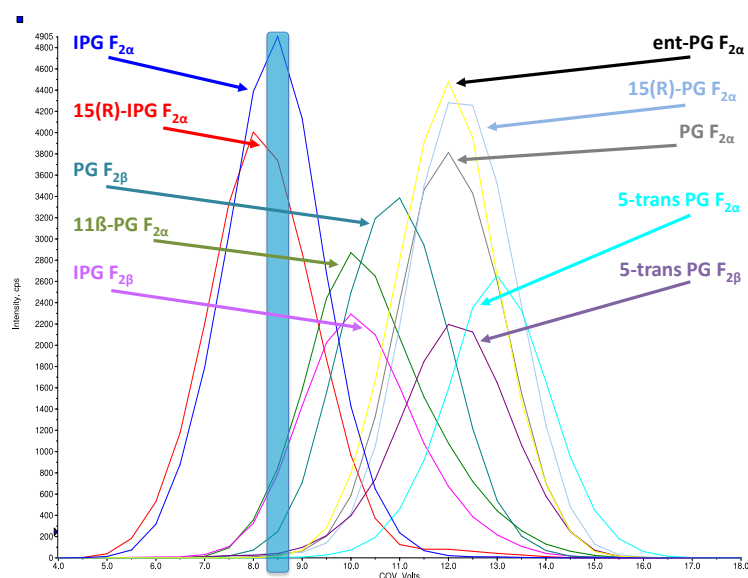


Abb. 7.2.: Darstellung der Lage der Kompensationsspannungen (COV) aller Referenzsubstanzen; die jeweiligen Isomere sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet. Mit der Ausnahme von 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ (rot) liegen die COV-Optima aller anderen Isomere deutlich höher als beim Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ (dunkelblau). Der Bereich der idealen Kompensationsspannung von IPG $F_{2\alpha}$ ist als blauer Bereich markiert, nur wenige andere Isoprostane zeigen in diesem Band überhaupt ein Signal. Diese Isomere sind als potentielle Interferenzen in der Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS) anzusehen.

In Abbildung 7.3 wurden nur die Substanzen dargestellt, welche eine relevante Überschneidung im Bereich der optimalen Einstellung der Kompensationsspannung (COV) von IPG F_{2α} zeigten. Bezogen auf das SelexION handelte es sich bei diesen Analyten um potentielle Störungen, da bei einer Einstellung des Systems auf die optimale Kompensationsspannung des Zielanalyten IPG F_{2α} noch (sehr geringe) Anteile der anderen Isomere durch die DMS-Zelle hindurch gelangten, diese Substanzen wurden also nicht vollständig selektiert.

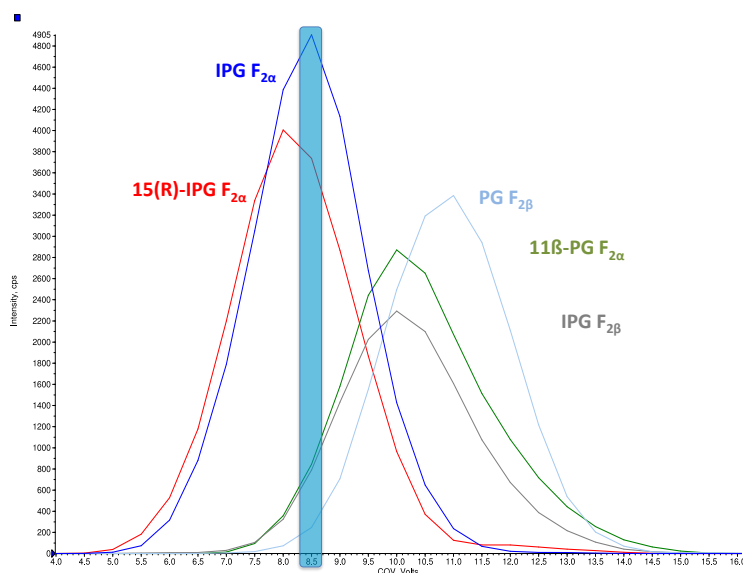


Abb. 7.3.: Darstellung der Lage der Kompensationsspannungen (COV) der potentiell interferierenden Isomere; die jeweiligen Verbindungen sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet. Der Bereich der idealen Kompensationsspannung von IPG F_{2α} ist als blauer Bereich markiert, nur wenige andere Isoprostane zeigen in diesem Band überhaupt ein Signal.

Da die meisten potentiell interferierenden Isomere ein höher liegendes Optimum der Kompensationsspannung als IPG F_{2α} aufwiesen, wäre durch die bewusste Verwendung eines Wertes unterhalb des Optimums der Kompensationsspannung von IPG F_{2α} eine verbesserte Selektivität erreichbar. Dieses würde allerdings mit dem Nachteil einer geringeren Sensitivität erkauft, da hierzu die Einstellung der Kompensationsspannung aus dem Maximum der Signalstärke von IPG F_{2α} in dessen Flanke verschoben werden muss (s. Abb. 7.4 auf der nächsten Seite).

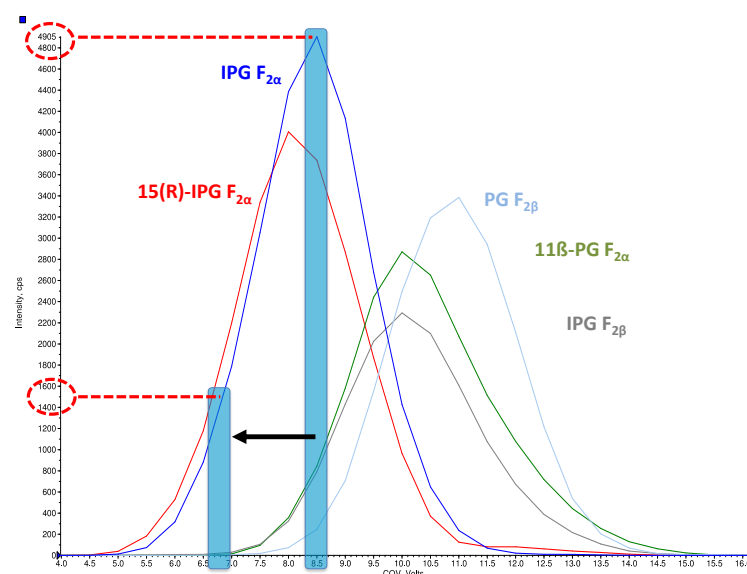


Abb. 7.4.: Darstellung der möglichen Verschiebung der Kompensationsspannung (COV) zur Steigerung der Selektivität; die ideale Kompensationsspannung von IPG $F_{2\alpha}$ ist als blauer Bereich markiert. Diese kann bewusst „falsch“ gewählt werden und von ihrem Maximum zu einer niedrigeren COV-Einstellung verschoben werden (durch den Pfeil angedeutet). Dieses resultiert in einer höheren Selektivität, da unter diesen Bedingungen von den potentiellen Interferenzen keine Signale mehr die DMS-Zelle passieren. Gleichzeitig verringert sich jedoch auch die Sensitivität von IPG $F_{2\alpha}$ (rote Markierungen) durch die Verwendung einer anderen Kompensationsspannung.

Da sich die Ionogramme der Isomere IPG $F_{2\alpha}$ und 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ fast vollständig überlappen, war hier keine Selektivität durch die Verwendung der Differentiellen Mobilitätsspektrometrie erreichbar. Diese beiden Verbindungen mussten chromatographisch voneinander getrennt werden, alle übrigen Analyte könnten durch eine entsprechende Einstellung der Kompensationsspannung völlig selektiert werden. Eine Senkung der Einstellung der Kompensationsspannung zur Selektivitätssteigerung war bei der verwendeten Methode nicht nötig (s. unter 6.10.2 auf Seite 96), die Einstellungen im Maximum des Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ bewirkten in der Praxis eine komplette Ausblendung aller anderen Isomere mit Ausnahme der Verbindung 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$.

DMS-Selektivität in Realmatrix

Das Ziel der Optimierung des Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS)-Moduls SelexION in dieser Arbeit bestand darin, eine möglichst starke Transmission des Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ bei möglichst vollständiger Unterdrückung der Signale aller übrigen Isomere zu erreichen. Potentiell interferierende Isoprostane waren gemäß der verwendeten Literatur nur in geringem Umfang in Urinproben zu erwarten, mehrere der theoretisch möglichen Isomere konnten in Urinen bisher nicht nachgewiesen werden [70, 100, 101]. Bei Isomeren mit nicht ausreichender Selektivität zu IPG $F_{2\alpha}$ durch das DMS war eine chromatographische Trennung nötig. Abgesehen von der Verbindung 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$, welche jedoch chromatographisch separat erfassbar war, wurden die Signale aller übrigen geprüften Isomere durch das SelexION bei den gewählten Einstellungen vollständig ausgeblendet (s. unter 6.10.2 auf Seite 96). Die folgenden Abbildungen verdeutlichen die durch die Differentielle Mobilitätsspektrometrie bewirkte Selektivität der im vorliegenden Fall relevanten Isomere.

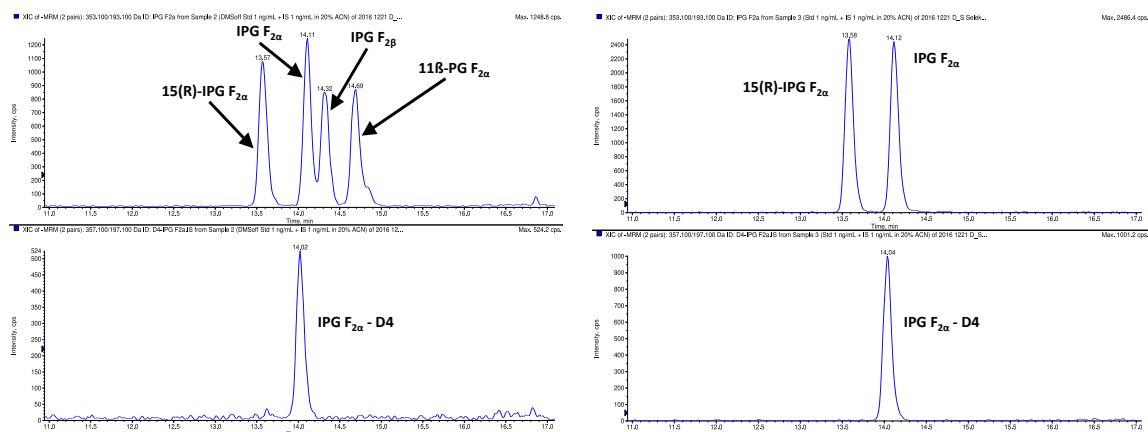


Abb. 7.5.: Darstellung der Selektivität mit und ohne DMS-Modul am Beispiel einer Standard-Mischung (1 ng/mL in 20 % (v/v) Acetonitril in Wasser); links: ohne DMS sind alle vier Isomere der Mischung gut erkennbar; rechts: mit SelexION sind nur noch die Signale von IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} sichtbar; jeweils im unteren Teil der Abbildung ist der interne Standard dargestellt.

In Abbildung 7.5 wird links ohne Verwendung eines DMS-Moduls die chromatographische Trennung zwischen den hier relevanten Analyten dargestellt. Dabei ist auch die ausreichende Antrennung des Zielanalyten IPG F_{2α} zu dem in Urin bisher nicht nachgewiesenen Isomer IPG F_{2β} erkennbar. Der rechte Teil der Abbildung zeigt den gleichen Versuch, aber mit der durch das SelexION verbesserten Selektivität. Mit Ausnahme des chromatographisch deutlich vom Zielanalyten IPG F_{2α} abgetrennten 15(R)-IPG F_{2α} wurden alle anderen Isomere völlig ausgeblendet. Die Konfigurationsänderung der Hydroxylgruppe in der Seitenkette von 15(R)-IPG F_{2α} veränderte den Querschnitt des Moleküls nicht ausreichend genug, um unter den gewählten DMS-Bedingungen diese beiden Isomere selektiv voneinander erfassen zu können. Die Signalintensitäten stiegen bei Verwendung des SelexION-Moduls an, dieses wurde vermutlich durch einen Fokussierungseffekt verursacht.

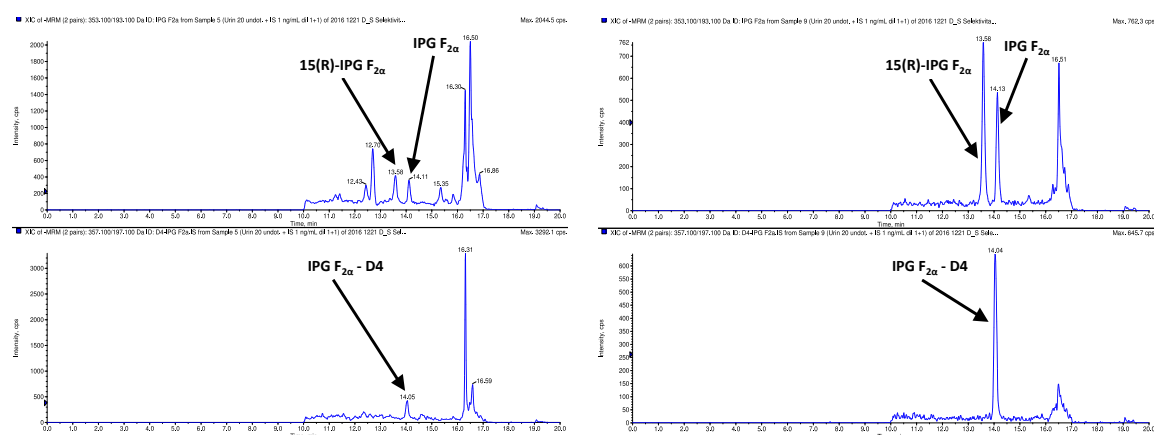


Abb. 7.6.: Darstellung der Selektivität mit und ohne DMS-Modul am Beispiel von Urin Nr. 20 (undotiert); links: ohne DMS sind neben den beiden Isomeren IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} mehrere andere Signale erkennbar; rechts: mit SelexION reduziert sich die Anzahl der Signale deutlich; jeweils im unteren Teil der Abbildung ist der interne Standard dargestellt; auch hier ist in der linken Abbildung ein deutliches Signal einer Interferenz bei R_t = 16,31 min sichtbar.

In Abbildung 7.6 auf der vorherigen Seite wird in vergleichbarer Weise ein undotierter Realurin dargestellt. Im linken Teil sind ohne DMS neben dem Zielanalyten IPG F_{2α} diverse weitere Signale erkennbar. Die Chromatogramme wurden durch die Verwendung des SelexION-Moduls (rechte Seite der Abbildung) deutlich von zusätzlichen Signalen bereinigt. Das Grundrauschen sank dabei ebenfalls, so dass die Peaks deutlicher hervortraten. Vermutlich durch einen Fokussierungseffekt des SelexIONs verursacht stieg zusätzlich die Signalintensität an. Auch auf der Massenspur des internen Standards waren intensive Zusatzsignale erkennbar, dieses entspricht der Beschreibung aus der Literatur [100, 227]. Diese isobaren Substanzpeaks konnten durch die Verwendung eines SelexION-Moduls effektiv herausgefiltert werden.

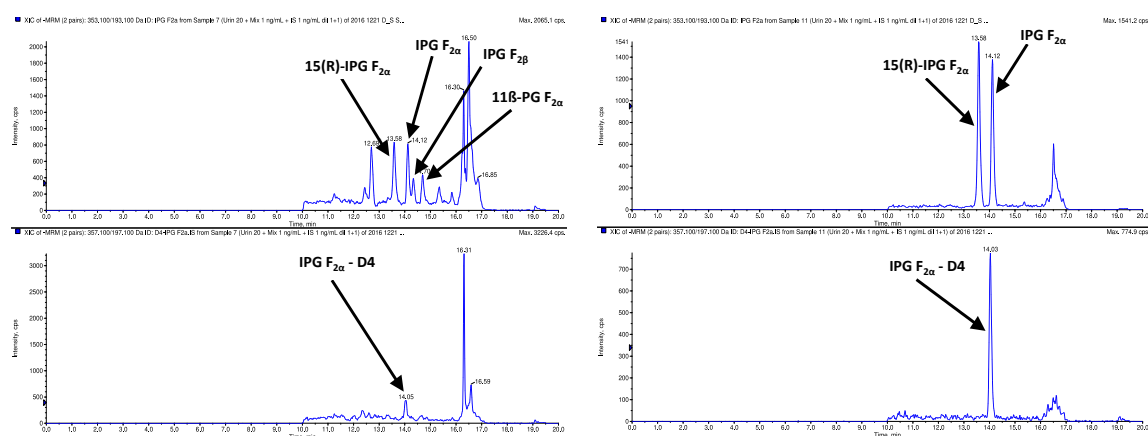


Abb. 7.7.: Darstellung der Selektivität mit und ohne DMS-Modul am Beispiel von Urin Nr. 20 (mit Standard-Mischung 1 ng/mL dotiert); links: ohne DMS sind neben diversen Zusatzsignalen aus der Urinmatrix die Isomere der Dotierung identifizierbar; rechts: mit SelexION sind nur noch die Signale von IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} erkennbar, alle anderen Interferenzen werden ausgeblendet; jeweils im unteren Teil der Abbildung ist der interne Standard dargestellt.

Abbildung 7.7 zeigt denselben Urin wie in Abbildung 7.6 auf der vorherigen Seite, nun mit dem bereits zuvor verwendeten Standard-Mix aufdotiert. Im linken Teil der Abbildung (ohne DMS) sind die aus Abbildung 7.5 auf der vorherigen Seite bekannten Isomere erkennbar. Bei Verwendung des SelexION-Moduls (rechter Teil) waren lediglich IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} sichtbar, alle anderen Isomere wurden komplett ausgeblendet. Die Reduktion der Anzahl der potentiellen Signale durch die Verwendung der unterschiedlichen Selektivitätsdimensionen der verwendeten analytischen Methode (LC-DMS/MS) wurde in Abbildung 7.8 auf der nächsten Seite dargestellt.

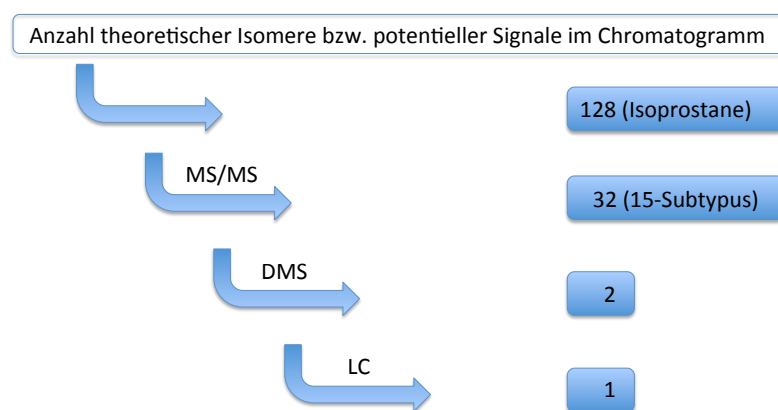


Abb. 7.8.: Reduktion der Anzahl von potentiellen chromatographischen Signalen durch die Selektivitätskomponenten der LC-DMS-MS/MS-Methode; das verwendete Verfahren konnte die theoretische Anzahl von bis zu 128 Isomeren auf effektiv ein chromatographisches Signal reduzieren.

Die theoretische Anzahl von 128 IPG $F_{2\alpha}$ -Isomeren (s. hierzu unter 2.5.3 auf Seite 10) konnte durch die analytische Kombination LC-DMS-MS/MS auf effektiv ein chromatographisches Signal reduziert werden. Die Abbildung 7.8 beschreibt dabei lediglich die Beobachtungen der ausgewerteten Taucherurinproben ($n = 234$). Es standen nicht alle 128 theoretischen Isomere zur Verfügung, um die Selektivitätskomponenten LC, DMS und MS/MS separat voneinander auf ihre Wirksamkeit hin prüfen zu können. Ein wesentlicher Reduktionsfaktor war dabei die MS/MS-Detektion, diese sorgte für eine Selektion der Regiomerklasse der 15-Serie, welcher aus noch 32 Isomeren bestand. In Realurinproben ($n = 234$) wurden bei Verwendung eines DMS-Moduls nur zwei Signale detektiert, dabei handelte es sich um die Isoprostane 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ und IPG $F_{2\alpha}$, alle anderen Isomere wurden entweder in Realmatrix nicht bzw. in einer zu geringen Menge gebildet oder durch das SeleXION herausgefiltert. Da die beiden Isomere 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ und IPG $F_{2\alpha}$ chromatographisch deutlich voneinander getrennt vorlagen, konnte das Signal des Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ eindeutig identifiziert werden, gerade in Verbindung mit dem verwendeten internen Standard IPG $F_{2\alpha}$ -D4.

Dabei muss berücksichtigt werden, dass dieses Signal theoretisch aus IPG $F_{2\alpha}$ und dessen Enantiomer ent-IPG $F_{2\alpha}$ besteht. Eine Trennung dieser Enantiomere war unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich, dieses ist beispielsweise an dem Enantiomerenpaar PG $F_{2\alpha}$ und ent-PG $F_{2\alpha}$ erkennbar (s. Tab. 6.13 auf Seite 97). Diese beiden Enantiomere können mit der entwickelten Methode weder massenspektrometrisch oder chromatographisch, noch durch die Verwendung des DMS-Moduls getrennt werden (s. Tab. 6.3 auf Seite 65). In der verfügbaren Literatur wird sehr selten über Chiraltrennungen im Zusammenhang mit Isoprostanen berichtet. Lediglich bei Yin et al. [67] und Goss et al. [228] wird dieses Thema behandelt, aber auch dabei wird keine Trennung des Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ von seinem Enantiomer ent-IPG $F_{2\alpha}$ beschrieben.

Alle in der Literatur beschriebenen Messungen von Isoprostanen, auch Grundlagen wie die Festlegung von Normalbereichen, wurden ohne eine Enantiomerenentrennung durchgeführt. Eine solche Trennung der Isoprostan-Enantiomere ergibt für die Indikation von oxidativem Stress keine Vorteile. Die Moleküle von IPG $F_{2\alpha}$ und seinem Enantiomer ent-IPG $F_{2\alpha}$ sind in allen Stereozentren entgegengesetzt ausgerichtet (s. Abb. 7.9 auf der nächsten Seite). Da die Bildung der Isoprostane nicht-enzymatisch und daher chemisch-statistisch geprägt abläuft, ist die Wahrscheinlichkeit der Bildung beider Enantiomere gleich groß. Daher ist auch die Aussagekraft beider Stereoisomere in Hinblick auf oxidativen Stress gleich zu werten und eine Trennung dieser insofern nicht notwendig.

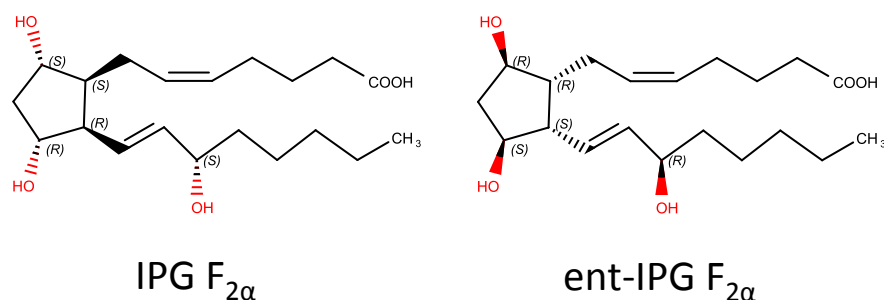


Abb. 7.9.: Darstellung der Strukturformeln der Enantiomere $\text{IPG F}_{2\alpha}$ und $\text{ent-IPG F}_{2\alpha}$; alle fünf Stereozentren sind genau entgegengesetzt ausgerichtet.

Während des Schreibens dieser Arbeit wurde ein Artikel von Liang et al. [215] veröffentlicht, in welchem zum ersten Mal eine $\text{IPG F}_{2\alpha}$ -Analytik mittels SelexION beschrieben wurde (s. unter 7.1 auf Seite 127). Liang et al. [215] führen darin eine potentielle Interkonversion der Epimere $\text{IPG F}_{2\alpha}$ und $\text{PG F}_{2\alpha}$ ineinander in der DMS-Zelle als neuen Aspekt ein. Sie konnten feststellen, dass unter ungünstigen Bedingungen bis zu 3 % des Zielanalyten $\text{IPG F}_{2\alpha}$ in das Isomer $\text{PG F}_{2\alpha}$ umgewandelt wurden, umgekehrt konnte keine Konversion festgestellt werden. Die in der Veröffentlichung verwendete Methode wurde als frei von einer Umwandlung der Epimere ineinander beschrieben.

Eine potentielle Interkonversion der genannten Isomere wurde im Vorfeld dieser Arbeit nicht explizit geprüft. Liang et al. [215] beschreiben eine Umwandlung von 3 % $\text{IPG F}_{2\alpha}$ unter absichtlich ungünstig gewählten Bedingungen zu $\text{PG F}_{2\alpha}$ als worst-case-Szenario, dieser potentielle Verlust an Zielanalyt liegt deutlich im Rahmen einer üblichen Messunsicherheit oder zulässigen Präzision einer Ultrapurenanalytik. Da die Aufgabenstellung aus einem vorher-nachher-Vergleich von Proben desselben Individuums bestand, wäre die Auswirkung einer solchen Konversion vernachlässigbar gering, sofern die Epimerenumwandlung unter den gewählten Messbedingungen reproduzierbar stattfindet. Liang et al. [215] verwenden andere Bedingungen im SelexION als in dieser Arbeit, beispielsweise zusätzliche organische Modifier um die DMS-Trennkapazität zu erhöhen. In wie weit die Ergebnisse auf das für diese Arbeit verwendete System übertragbar sind bleibt damit fraglich, zumal die Interkonversion unter möglichst ungünstigen Bedingungen beschrieben wurde und es laut den Autoren auch Einstellungen ohne eine messbare Umwandlung der Epimere gab. Im Falle einer Konversion würde dieses zum Verlust von bis zu 3 % des Zielanalyten $\text{IPG F}_{2\alpha}$ führen, da dieser im SelexION zu $\text{PG F}_{2\alpha}$ konvertiert und dann direkt zumindest teilweise noch selektiert werden würde. Falls keine Abtrennung im SelexION stattfindet z. B. aufgrund einer zu geringen Elektrodenstrecke nach der Interkonversion, so würde es zu keiner Veränderung der Ergebnisse kommen, da sich die Epimere $\text{IPG F}_{2\alpha}$ und $\text{PG F}_{2\alpha}$ massenspektrometrisch gleich verhalten, aber bereits chromatographisch getrennt vorliegen. Fallen die Selektivitätskomponenten Chromatographie und Differentielle Mobilitätsspektrometrie weg (bzw. erfolgt erst hier die Interkonversion), so reicht eine MS/MS-Detektion alleine nicht aus um die Stereoisomere $\text{IPG F}_{2\alpha}$ und $\text{PG F}_{2\alpha}$ voneinander zu unterscheiden. Als Folge daraus würde zur Retentionszeit von $\text{IPG F}_{2\alpha}$ aus diesem Zielanalyt im DMS erzeugtes $\text{PG F}_{2\alpha}$ nicht selektiv detektiert, sondern aufgrund derselben Fragmente als $\text{IPG F}_{2\alpha}$ identifiziert werden.

Im Gegensatz zu den Versuchen von Liang et al. [215] wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem isopenmarkierten internen Standard gearbeitet. Es wurde davon ausgegangen, dass der interne Standard den gleichen Effekten wie der Zielanalyt unterliegt und damit auch eine potentielle Epimerenkonversion effektiv kompensieren würde.

Vergleich von IPG F_{2α}-Messungen mit und ohne Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS)

Zum Vergleich der Ergebnisse ohne Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS) bzw. mit dem DMS-Modul SelexION wurden alle gemessenen Urinproben der Taucher ($n = 234$) herangezogen. Dabei ergab sich eine statistisch signifikante Abweichung, die Ergebnisse mit SelexION lagen systematisch um 3,3 % höher als ohne DMS-Modul (s. unter 6.13 auf Seite 121). Bezogen auf die IPG F_{2α}-Mittelwerte der Messungen entsprach dieses einer absoluten mittleren Differenz von 5,7 pg/mL (s. Abb. 6.63 auf Seite 121) und war obgleich statistisch signifikant als gering einzustufen. Eine systematische Abweichung von 5,7 pg/mL lag im Bereich der Nachweisgrenze des verwendeten Verfahrens (s. unter 6.10.6 auf Seite 108 bzw. Tab. 6.22 auf Seite 109), ein Unterschied von 3,3 % lag unterhalb der Messpräzision des hier verwendeten Verfahrens (s. unter 6.10.4 auf Seite 106 bzw. Tab. 6.18 auf Seite 106). Eine mögliche Auswirkung der geringen systematischen Abweichung auf die praktische Anwendung der Methode war daher als nicht relevant zu bewerten. Als mögliche Ursache der geringen aber signifikanten Abweichung war die Integration der Signale denkbar. Die Verwendung des SelexION-Moduls reduzierte den chromatographischen Untergrund deutlich, gerade die Flanken der Peaks waren dadurch besser erkennbar. Dieses vereinfachte die Integration der Peaks des Zielanalyten IPG F_{2α} deutlich, dieses galt ebenso für die Signale des deuterierten internen Standards. Ein Beispiel dazu wurde in Abbildung 7.10 dargestellt. Im oberen Teil der Abbildung ist eine sehr selten vorkommende chromatographische Störung des internen Standards IPG F_{2α}-D4 durch Coelution einer unbekannten Substanz erkennbar, welche bei der Verwendung des SelexION-Moduls (unterer Teil der Abbildung) vollständig ausgeblendet wurde. Im gemessenen Kollektiv ($n = 234$) wurde eine Störung des internen Standards nur in insgesamt drei Urinen und somit 1,3 % aller Proben beobachtet.

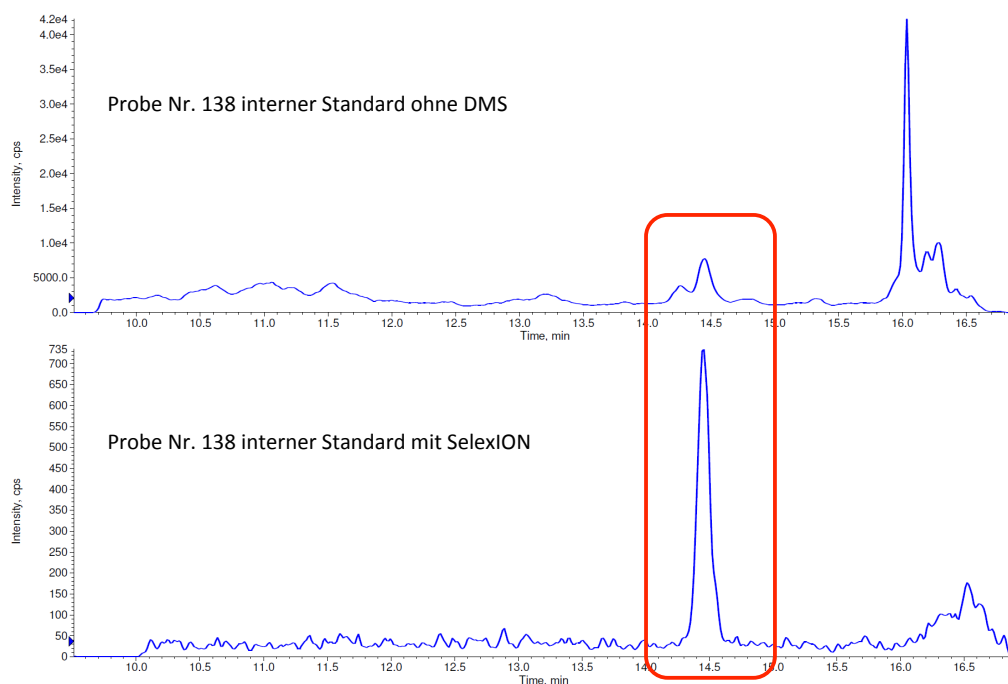


Abb. 7.10.: Darstellung eines Vergleichs von Messungen mit und ohne DMS-Modul am Beispiel des internen Standards IPG F_{2α}-D4 von Taucherurin Nr. 138; oben: ohne DMS wird der interne Standard durch Coelution einer unbekannten Substanz gestört; unten: mit SelexION wird die Störung komplett ausgeblendet.

Ergab der Methodenvergleich bezogen auf absolute Messwerte einen geringen Unterschied, so zeigten sich in der Auswertung der Signal-Rausch-Verhältnisse (S/N) deutliche Veränderungen zwischen den

Messungen ohne DMS und mit SelexION (s. unter 6.13 auf Seite 121 bzw. Abb. 6.64 auf Seite 122). Ohne DMS lag der S/N-Mittelwert der IPG $F_{2\alpha}$ -Signale aller Taucherproben mit S/N 32 deutlich unter dem Mittelwert der Messungen mit SelexION von S/N 113. Das Signal-Rausch-Verhältnis verbesserte sich im Durchschnitt aller Proben ($n = 234$) um den Faktor 3,5 durch die Verwendung des SelexION-Moduls (s. Abb. 6.64 auf Seite 122). Beispielhaft wird folgend ein optischer Vergleich dreier Urinproben (s. Abb. 7.11 und 7.12 auf der nächsten Seite und 7.13 auf Seite 147) bezüglich Signalstärke und Untergrund ohne DMS bzw. mit SelexION dargestellt.

Tab. 7.3.: Kenndaten der Urine des Vergleichs der Messungen mit und ohne DMS-Modul

	Probe 20	Probe 22	Probe 138
Probennahmezeitpunkt	nach Tauchgang	vor Tauchgang	6 h nach Tauchgang
Creatinin [mg/L]	127	3585	1727
IPG $F_{2\alpha}$ [pg/mL]	18,4	558,1	392,8
IPG $F_{2\alpha}$ [pg/mg Creatinin]	144,9	155,7	227,4

Die für diese vergleichende Darstellung ausgewählten Urine beinhalten alle Probennahmezeitpunkte (vor, nach und sechs Stunden nach einem Tauchgang) und decken einen weiten Bereich von Urinkonzentrationen ab (127-3585 mg Creatinin/L). Der gemessene IPG $F_{2\alpha}$ -Gehalt dieser Urinproben variierte zwischen 18-558 pg/mL (s. Tab. 7.3), wobei der Messwert von Urin Nr. 20 mit 18 pg/mL unterhalb der verwendeten Kalibration (25-5000 pg/mL) lag. Das Signal war deutlich oberhalb der Nachweisgrenze und konnte problemlos integriert werden (s. Abb. 7.11), dennoch handelt es sich um einen extrapolierten Wert, der einer höheren Schwankung unterliegt als die übrigen Ergebnisse.

In Abbildung 7.11 wurde ein sehr gering konzentrierter Urin (127 mg Creatinin/L) mit einem sehr geringen IPG $F_{2\alpha}$ -Messwert (18 pg/mL) dargestellt.

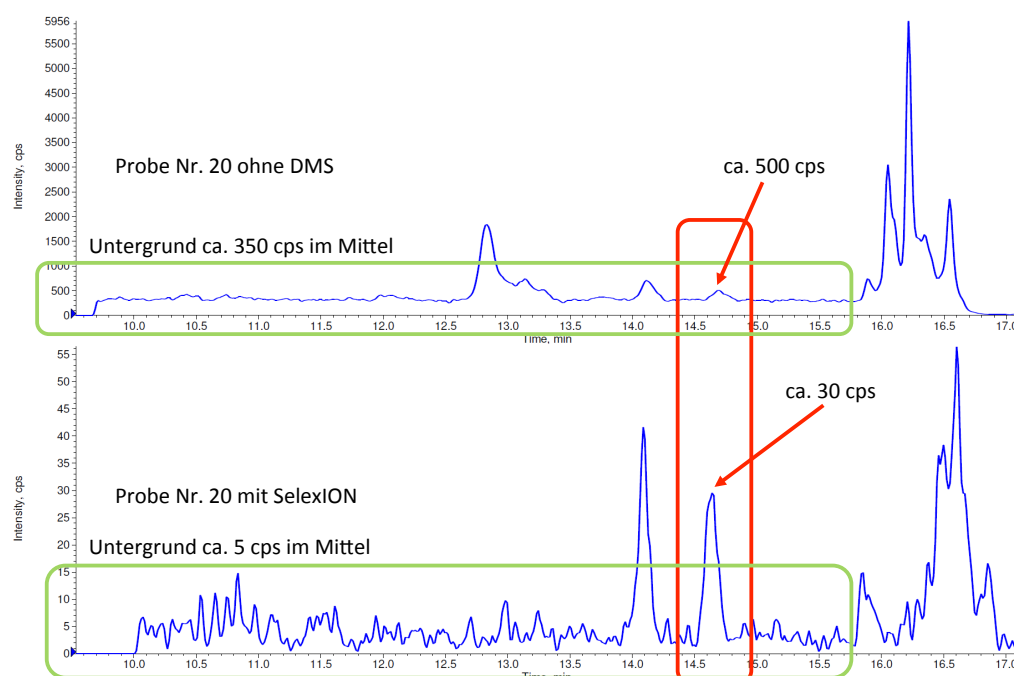


Abb. 7.11.: Darstellung eines Vergleichs von Messungen mit und ohne DMS-Modul am Beispiel von Taucherurin Nr. 20 (oben: ohne DMS bzw. unten: mit SelexION); die rote Markierung zeigt die Lage des IPG $F_{2\alpha}$ -Signals, die grüne Markierung das betrachtete Untergrundsignal.

Abbildung 7.12 zeigt einen sehr stark konzentrierten Urin (3585 mg Creatinin/L) mit einem IPG $F_{2\alpha}$ -Messwert von 558 pg/mL.

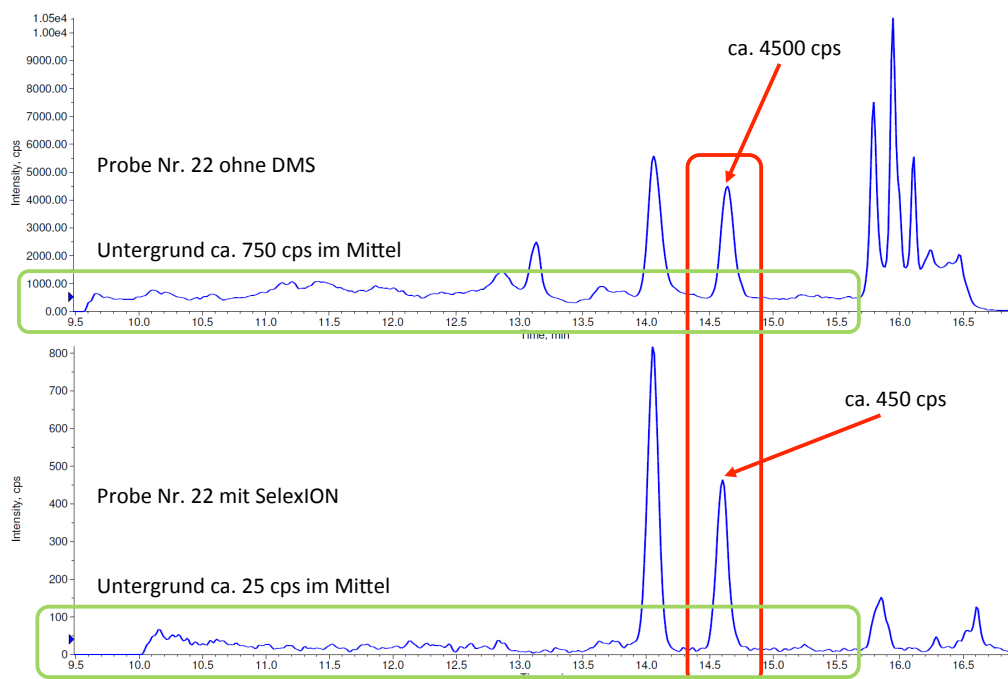


Abb. 7.12.: Darstellung eines Vergleichs von Messungen mit und ohne DMS-Modul am Beispiel von Taucherurin Nr. 22 (oben: ohne DMS bzw. unten: mit SelexION); die rote Markierung zeigt die Lage des IPG $F_{2\alpha}$ -Signals, die grüne Markierung das betrachtete Untergrundsignal.

In Abbildung 7.13 auf der nächsten Seite wurde ein konzentrierter Urin (1727 mg Creatinin/L) mit einem IPG $F_{2\alpha}$ -Messwert von 393 pg/mL dargestellt. Dieser Urin zeigte ohne Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS) chromatographische Störungen des internen Standards, welche durch die Verwendung des SelexION-Moduls eliminiert wurden (s. Abb. 7.10 auf Seite 144).

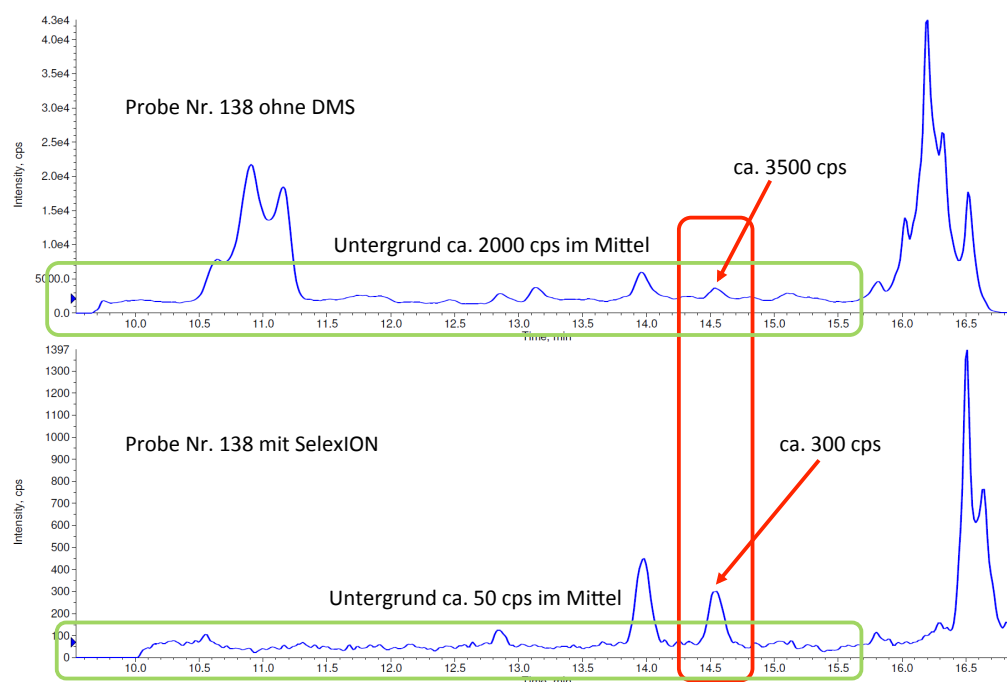


Abb. 7.13.: Darstellung eines Vergleichs von Messungen mit und ohne DMS-Modul am Beispiel von Taucherurin Nr. 138 (oben: ohne DMS bzw. unten: mit SelexION); die rote Markierung zeigt die Lage des IPG $F_{2\alpha}$ -Signals, die grüne Markierung das betrachtete Untergrundsignal.

Im Vergleich zu den Urinen Nr. 20 und 22 lag aus unbekannter Ursache der chromatographische Untergrund bei Urin Nr. 138 deutlich höher und dieser Urin zeigte wesentlich mehr Zusatzsignale. Zum Vergleich der drei Urinproben wurden die entsprechenden optischen Ergebnisse aus den jeweiligen Abbildungen in Tab. 7.4 zusammengestellt.

Tab. 7.4.: Ergebnisse des Vergleichs der Messungen mit und ohne DMS-Modul

	Probe 20	Probe 22	Probe 138
IPG $F_{2\alpha}$ [cps] ohne DMS	500	4500	3500
Untergrund [cps] ohne DMS	350	750	2000
Signal / Rausch-Verhältnis ohne DMS	1,4	6	1,8
IPG $F_{2\alpha}$ [cps] mit SelexION	30	450	300
Untergrund [cps] mit SelexION	5	25	50
Signal / Rausch-Verhältnis mit SelexION	6	18	6
Steigerungsfaktor S/N-Verhältnis	4,3	3	3,3

Zunächst war eine Reduktion der Signalintensitäten bei der Verwendung des DMS-Moduls SelexION auffällig. Die Intensität der IPG $F_{2\alpha}$ -Signale sank im Mittel um einen Faktor von 13 im Vergleich zu den Messungen ohne SelexION. Allerdings sank das Untergrundsignal gleichzeitig im Schnitt um den Faktor 47 und damit viel stärker als der Verlust an Messsignal des Zielanalyten. Durchschnittlich

(bezogen auf die optische Auswertung der drei hier dargestellten Urine) wurde das Signal-Rausch-Verhältnis durch die Verwendung des SelexION-Moduls um den Faktor 3,5 gesteigert. Das entspricht genau der Steigerung der Auswertung aller Taucherproben ($n = 234$) im Vergleich der S/N-Werte ohne DMS bzw. mit SelexION (s. unter 6.13 auf Seite 121 bzw. Abb. 6.64 auf Seite 122), die S/N-Werte wurden bei der dort durchgeführten Berechnung mit Hilfe der Software MultiQuant (Sciex) und nicht wie in diesen drei Beispielen optisch ermittelt.

7.2.1. Fazit zu Hypothese 2

Ähnlich wie Hypothese 1 Teil c (s. unter 7.1 auf Seite 128) war der Hintergrund von Hypothese 2 das Thema Selektivität, hier allerdings speziell auf den Einsatz der Differentiellen Mobilitätsspektrometrie (DMS) bezogen. Die Gruppe der Isoprostane besteht aus 128 isomeren Verbindungen (s. hierzu unter 2.5.3 auf Seite 10), diese Zahl von zu trennenden Substanzen konnte durch die MS/MS-Detektion auf 32 Isomere eingeschränkt werden. Da die Trenntechnik DMS auf anderen physikalischen Prinzipien beruht als Chromatographie und Massenspektrometrie, ergab sich die Möglichkeit hierüber die Selektivität der Analysenmethode zu steigern. Bereits geringe Veränderungen in der Molekülgeometrie der 32 relevanten Isomere konnten mit Hilfe eines SelexION-Moduls zu einer selektiven Detektion genutzt werden.

Die Bearbeitung von Hypothese 2 sollte prüfen, in wie weit eine Selektion der verfügbaren Standardsubstanzen mit Hilfe der Differentiellen Mobilitätsspektrometrie möglich war. Weiterhin wurde in einem Methodenvergleich geprüft, ob es durch die Verwendung eines DMS-Moduls zu einer Steigerung der Sensitivität der Methode in Form des Signal-Rausch-Verhältnisses kam.

Zunächst wurden die Einstellungen des SelexION-Moduls für den Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ optimiert. Unter diesen Bedingungen wurden bereits fast alle anderen verfügbaren Isomere komplett ausgeblendet, lediglich 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ war dem Zielanalyten für eine Trennung alleine durch DMS zu ähnlich (s. unter 6.10.2 auf Seite 96). Die beiden Isomere IPG $F_{2\alpha}$ und 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ stellten aufgrund ihrer guten chromatographischen Trennung in Kombination mit einer LC allerdings kein Problem dar. Mit den für den Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ optimierten Einstellungen wurden alle anderen kommerziell verfügbaren Isomere bei der Messung von Urinproben mit Ausnahme der Verbindung 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ komplett ausgeblendet.

Durch die Verwendung eines DMS-Moduls konnten die in einem Urin vorkommenden zusätzlichen Signale und der Untergrund verringert werden. Die Kombination LC-DMS-MS/MS war in der Lage, die theoretische Anzahl von 128 IPG $F_{2\alpha}$ -Isomeren (s. hierzu unter 2.5.3 auf Seite 10) effektiv auf ein chromatographisches Signal zu reduzieren (s. Abb. 7.8 auf Seite 142).

An den Urinproben der Taucher ($n = 234$) wurden vergleichende Messungen mit und ohne DMS-Modul durchgeführt (s. unter 6.13 auf Seite 121). Dabei ergab sich eine zwar signifikante Abweichung von 3,3 %, welche aber gering und daher in der realen Anwendung nicht relevant war. Der Einsatz eines SelexION-Moduls verringert die Signalstärke aufgrund eines längeren Flugweges der Ionen bei Atmosphärendruck deutlich. Dieses wurde durch eine noch stärkere Reduktion des Untergrunds überkompensiert, so dass im Endeffekt das Signal-Rausch-Verhältnis im Vergleich zu Messungen ohne DMS-Modul um den Faktor 3,5 verbessert wurde (s. hierzu Abb. 6.64 auf Seite 122 bzw. unter 7.2 auf Seite 144).

7.3. Ausblick

Die Gewinnung der Proben wurde vollständig anonymisiert durchgeführt, eine Rückverfolgbarkeit oder Zuordnung der Ergebnisse zu individuellen Tauchern ist nicht möglich. Die Proben waren entsprechend ihrer Zugehörigkeit als Set gekennzeichnet, aber ohne Hinweise auf den jeweiligen Taucher.

Damit entfällt die Möglichkeit, Messwerte eines Individuums bei verschiedenen Tauchgängen und damit verschiedenen Sauerstoffbelastungen zu betrachten. Dadurch wäre beispielsweise eine individuelle Korrelation zwischen Veränderungen der IPG $F_{2\alpha}$ -Werte und der Sauerstoffbelastung ermöglicht worden, durch diese hätte man Informationen über die Auswirkung des Individuums auf die Messwerte erhalten können. Rückwirkend betrachtet ist dieses eine Limitierung des Studiendesigns, welche in dieser Form nicht nötig gewesen wäre. Eine Verblindung hätte auch in einer Form erfolgen können, so dass die Proben den dennoch anonymisierten individuellen Tauchern zugeordnet werden könnten.

Vergleich zu IPG $F_{2\alpha}$ -Bestimmungen aus der Literatur

Ein Vergleich zwischen den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen und Untersuchungen aus der Literatur gestaltet sich schwierig. Tauchen ist ein spezielles Modell zur Erzeugung von oxidativem Stress, da in diesem Fall gesunde Probanden untersucht werden. In der verfügbaren Literatur werden üblicherweise Tiermodelle oder ein Kollektiv aus Patienten mit einer speziellen Erkrankung als Modell des oxidativen Stresses verwendet.

Bisher wurden nur sehr wenige Biomarker des oxidativen Stresses erfolgreich in einem Tier- oder Humanmodell überprüft [229]. Gemäß der verfügbaren Literatur wurde IPG $F_{2\alpha}$ als einziger Parameter sowohl in Tiermodellen [206] wie auch in Humanmodellen [208] als sensibler Biomarker zur Messung von oxidativem Stress validiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig die Abhängigkeit der Veränderung der IPG $F_{2\alpha}$ -Werte in Urinproben von Tauchern direkt nach einem Tauchgang mit der dabei bestehenden Sauerstoffbelastung korreliert werden (s. unter 6.11.3 auf Seite 116).

Akute Veränderungen von IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen durch einen Tauchgang sind bisher nicht ausreichend untersucht worden. In der verfügbaren Literatur sind keine selektiven Quantifizierungen der beiden Isoprostane IPG $F_{2\alpha}$ und 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ aus Urin von Tauchern beschrieben worden. Alcaraz-Garcia [223] konnte mittels Immunoassay eine langfristige Senkung der IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen bei Tauchern nachweisen (s. Tab. 7.5 auf der nächsten Seite). Im Vergleich zum Start des Trainingsprogramms sanken die Messwerte hierbei nach sechs Wochen im Schnitt um -43 %, nach zwölf Trainingswochen um -59 % bezogen auf die Ausgangswerte. Allerdings ist dieses den Autoren nach auf einen Adaptionseffekt der Taucher an den erhöhten oxidativen Stress zurückzuführen [223].

In Ermangelung von weiteren Untersuchungen an Tauchern bezüglich Isoprostanen wurden andere Kollektive zu einer Einsortierung der Messergebnisse herangezogen (s. Tab. 7.5 auf der nächsten Seite).

Tab. 7.5.: Literaturvergleich zu IPG $F_{2\alpha}$ -Messungen aus der Matrix Urin

Quelle	Kollektiv	Bemerkung	Veränderung [%]
Vergleich	Taucher	direkt nach Tauchgang	+10,3
Bohnstedt 2003 [70]	Alzheimer-Patienten		+11,6
Tsikas 2003 [141]	Raucher		+28,7
Helmersson 2004 [230]	Diabetiker	Diabetes Typ 2	+15,1
Helmersson 2005 [231]	Raucher		+14,4
Kadiiska 2005 [206]	Tiermodell: Ratten nach 7 h	120 mg/kg CCl_4 1200 mg/kg CCl_4	+335,6 +866,1
Kadiiska 2005 [206]	Tiermodell: Ratten nach 16 h	120 mg/kg CCl_4 1200 mg/kg CCl_4	+241,2 +496,1
Barden 2007 [232]	Alkoholiker		+22,5
Alcaraz-Garcia 2008 [223]	Taucher	Woche 6 Woche 12	-43,3* -58,6*
Ilyasova 2010 [208]	Chemotherapie mit Doxorubicin	nach 1 h nach 24 h	+61,5 +26,9

* In dieser Studie wurden Langzeiteffekte untersucht, die IPG $F_{2\alpha}$ -Werte sanken vermutlich aufgrund von Adaptionseffekten gegenüber den Ausgangswerten ab.

Es ist davon auszugehen, dass sich die in der Literatur angegebenen Veränderungen von IPG $F_{2\alpha}$ (s. Tab. 7.5 auf der vorherigen Seite) auf Mittelwerte beziehen, welche für Ausreißer anfälliger sind als eine Angabe der Mediane. Der in dieser Arbeit bestimmte signifikante Anstieg der IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen bezogen auf Creatinin direkt nach einem Tauchgang lag im Mittel bei +10 % (Median +6 %, s. Tab. 7.1 auf Seite 132) und ist in der Größenordnung vergleichbar mit Steigerungen bei Alkoholikern (+23 %), Rauchern (+14 % oder +29 %, je nach Quelle), sowie Diabetes (+15 %) und Alzheimer (+12 %) (s. Tab. 7.5 auf der vorherigen Seite). Die gemessenen Werte sind deutlich niedriger als in den Tier- und Humanmodellen, bei denen oxidativer Stress durch Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) erzeugt wurde [206] oder bei einer Chemotherapie mit Doxorubicin [208], also den beiden Modellen, anhand derer der Parameter IPG $F_{2\alpha}$ validiert wurde und seinen Status als Goldstandard der Messung des oxidativen Stresses erlangte (s. Tab. 7.5 auf der vorherigen Seite).

Vergleich zu anderen Markern des oxidativen Stresses aus der Literatur

Martinez-Moral [218] schlägt mehrere Biomarker zur Bestimmung des oxidativen Stresses aus Urin als indikativ für Schäden bzw. Veränderungen an bestimmten Biomolekülen vor, u. a. die in Tabelle 7.6 genannten Verbindungen.

Tab. 7.6.: Beispiele für Marker des oxidativen Stresses in der Matrix Urin

Marker	Abkürzung	geschädigte Biomoleküle
8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin	8-OH-dG	DNA
Allantoin	(ohne)	Harnsäure
Malondialdehyd	MDA	polyungesättigte Fettsäuren
Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$	IPG $F_{2\alpha}$	Arachidonsäure

Gemäß der BOSS-Studie [206] kamen für die Matrix Urin neben IPG $F_{2\alpha}$ noch MDA und 8-OH-dG in die engere Auswahl als geeignete Biomarker zur Bestimmung des oxidativen Stresses. Die beiden Lipidmarker IPG $F_{2\alpha}$ und MDA sind Indikatoren eines sich selbst fortpflanzenden Prozesses, welcher bis zu seinem Abbruch weiterläuft. Der Marker 8-OH-dG hingegen zeigt Schäden an DNA-Strängen an, welche vorwiegend durch Hydroxylradikale verursacht werden [233]. Aufgrund der endogenen Reparaturmechanismen wird bei der Bestimmung von DNA-Schäden die Summe eines Gleichgewichts zwischen Schädigung und Reparatur der DNA erfasst [233].

Seit einigen Jahren wird Allantoin als neuer und vielversprechender Biomarker des oxidativen Stresses diskutiert [125]. Es handelt sich dabei um das stabile Produkt der nicht-enzymatischen Oxidation von Harnsäure. Diese ist bei Menschen das Endprodukt des Purinstoffwechsels. Die meisten Tierarten wandeln Harnsäure durch das Enzym Uricase in Allantoin um, dem Menschen fehlt dieses Enzym, somit kann Allantoin nur durch nicht-enzymatische Vorgänge aus der antioxidativ wirkenden Harnsäure gebildet werden. [125, 208, 218, 229]

Zur Messung des oxidativen Stresses aus Urin eignen sich auch dihydroxylierte Benzoate (DHB) [2]. Diese stabilen Marker entstehen durch die Reaktion des extrem reaktiven Hydroxylradikals mit Hippursäure (Benzoylglycin) und werden über den Urin aus dem Körper eliminiert [234].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein signifikanter Anstieg der IPG $F_{2\alpha}$ -Werte pro Creatinin direkt nach einem Tauchgang von im Mittel +10 % (Median +6 %) festgestellt, beim Isomer 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ konnte eine Veränderung von +4 % im Mittel (+1 % Median) bestimmt werden (s. Tab. 7.1 auf Seite 132). Zum Vergleich wurden in Tabelle 7.7 auf der nächsten Seite Literaturdaten von anderen Parametern aufgeführt, welche üblicherweise als Marker des oxidativen Stresses verwendet werden.

Tab. 7.7.: Literaturvergleich zu anderen Markern des oxidativen Stresses aus der Matrix Urin

Quelle	Marker	Kollektiv	Bemerkung	Veränderung [%]
Vergleich	IPG F _{2α} 15(R)-IPG F _{2α}	Taucher	direkt nach Tauchgang	+10,3 +4,2
Tagesson 1996 [235]	MDA 8-OH-dG	Raucher	männliche Raucher	+12,4 +11,9
Bohnstedt 2003 [70]	15(R)-IPG F _{2α}	Alzheimer-Patienten		+1,2
Kadiska 2005 [206]	MDA	Tiermodell: Ratten nach 7 h	120 mg/kg CCl ₄ 1200 mg/kg CCl ₄	+148,1 +222,2
Kadiska 2005 [206]	MDA	Tiermodell: Ratten nach 16 h	120 mg/kg CCl ₄ 1200 mg/kg CCl ₄	+87,8 +163,4
Kadiska 2005 [206]	8-OH-dG	Tiermodell: Ratten nach 7 h	120 mg/kg CCl ₄ 1200 mg/kg CCl ₄	+68,0 +560,0
Kadiska 2005 [206]	8-OH-dG	Tiermodell: Ratten nach 16 h	120 mg/kg CCl ₄ 1200 mg/kg CCl ₄	+361,1 +233,3
Bader 2007 [236]	8-OH-dG	HBO-Therapie	131 min 100 % O ₂ 240 kPa	+24,3
Ilyasova 2010 [208]	Allantoin	Chemotherapie mit Doxorubicin	nach 1 h nach 24 h	+22,2 +28,8
Kähler 2013 [2]	DHB	Taucher		+66,3

Es ist davon auszugehen, dass sich die in der Literatur angegebenen Veränderungen der Marker des oxidativen Stresses (s. Tab. 7.7 auf der vorherigen Seite) auf Mittelwerte beziehen, welche für Ausreißer anfälliger sind als eine Angabe der Mediane. Der im Rahmen dieser Arbeit ermittelte signifikante Anstieg der IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen bezogen auf Creatinin direkt nach einem Tauchgang um +10 % im Mittel (Median +6 %) ist mit MDA- oder 8-OH-dG-Anstiegen von Rauchern (jeweils +12 %) vergleichbar. Ebenso zeigt 8-OH-dG einen Zuwachs in einer ähnlichen Größenordnung nach hyperbarer Sauerstoff (HBO)-Therapie (+24 %), die hierbei verwendete hyperbar-hyperoxische Umgebung kommt dabei den Bedingungen des Tauchens nahe, allerdings fehlt die Komponente der körperlichen Belastung. Insofern könnte 8-OH-dG ein sensitiverer Marker des oxidativen Stresses sein, wenn man davon ausgeht, dass eine körperliche Aktivität die ROS-Produktion deutlich steigern würde. Bei Alzheimer-Patienten zeigte 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ (+1 %) im Gegensatz zu IPG $F_{2\alpha}$ (+12 %) (s. Tab. 7.5 auf Seite 150) keinen relevanten Anstieg der Messwerte in Urin. In einem Humanmodell für oxidativen Stress ausgelöst durch die Injektion von Doxorubicin wurden zwar erhöhte Werte von Allantoin (+22 % nach einer Stunde) gemessen, der Anstieg war dabei jedoch geringer als der von IPG $F_{2\alpha}$ (+62 % nach einer Stunde) unter vergleichbaren Bedingungen (s. Tab. 7.5 auf Seite 150). Der in dieser Arbeit gemessene Anstieg der IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen direkt nach einem Tauchgang lag deutlich niedriger als in den Modellen, bei denen oxidativer Stress durch Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) erzeugt [206] und anhand von MDA oder 8-OH-dG bestimmt wurde (s. Tab. 7.7 auf der vorherigen Seite). Es handelt sich dabei um das Tiermodell, anhand dessen der Parameter IPG $F_{2\alpha}$ validiert wurde und seinen Status als Goldstandard der Messung des oxidativen Stresses erlangte. Auch hier zeigte unter vergleichbaren Voraussetzungen IPG $F_{2\alpha}$ einen deutlich stärkeren Anstieg als die Analyten MDA und 8-OH-dG (s. Tab. 7.5 auf Seite 150).

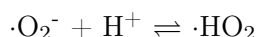
Einen besonderen Stellenwert nimmt die Bestimmung des oxidativen Stresses bei Tauchern über dihydroxylierte Benzoate (DHB) als Marker ein [2]. Aufgrund identischer Voraussetzungen mit starker körperlicher Aktivität unter hyperbar-hyperoxischen Bedingungen lag eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse vor. Der Anstieg der DHB ist mit +66 % deutlich stärker als bei IPG $F_{2\alpha}$ mit +10 % im Mittel (+6 % im Median) oder 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ mit +4 % im Mittel (+1 % im Median). In der Korrelation des Anstiegs mit der Sauerstoffbelastung zeigten IPG $F_{2\alpha}$ und DHB einen vergleichbaren und signifikant linearen Zusammenhang (s. Tab. 7.8).

Tab. 7.8.: Vergleich der Marker IPG $F_{2\alpha}$ und 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ mit DHB

Quelle	Parameter	Veränderung [%]	Bestimmtheitsmaß R^2
Vergleich	IPG $F_{2\alpha}$	+10,3	0,421
	15(R)-IPG $F_{2\alpha}$	+4,2	0,354
Kähler 2013 [2]	DHB	+66,3	0,432

Während die Bildung der DHB nahezu ausschließlich auf das extrem reaktive Hydroxylradikal zurückgeführt wird [1, 2, 234, 237], werden die Isoprostane in dieser Hinsicht als komplexer beschrieben [238]. Da Isoprostane aus noch mit Phospholipiden veresterter Arachidonsäure gebildet werden, muss der Ort dieses Vorgangs innerhalb der Biomembranen liegen [49] und die Reaktion damit in einer vollständig hydrophoben Umgebung ablaufen. Die hierfür nötige Lipophilie reduziert die Anzahl der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche die Peroxidationsreaktion initiieren können. Es wird aktuell davon ausgegangen, dass die Bildung von Isoprostanen nahezu ausschließlich auf das Perhydroxylradikal $\cdot HO_2$ zurückzuführen ist [238].

Das Perhydroxylradikal ist die protonierte Form des Superoxidanionradikals $\cdot\text{O}_2^-$, aber im Gegensatz dazu ein sehr starkes Oxidans, weit reaktiver und aufgrund der reversiblen Reaktion



in Zellen immer vorhanden [238].

Da es sich bei dem Hydroxylradikal um das reaktivste bekannte ROS handelt, könnte dieses erklären, warum der Anstieg des „Hydroxylradikal-Markers“ DHB größer ausfällt als bei dem „Perhydroxylradikal-Marker“ IPG $\text{F}_{2\alpha}$. Beide Marker zeigen einen ausgeprägten linearen Zusammenhang mit der Sauerstoffbelastung und sind daher als geeignete Marker zur Bestimmung von oxidativem Stress anzusehen. Zum Biomarker IPG $\text{F}_{2\alpha}$ ist eine Adaption von Tauchern an die erhöhte Sauerstofflast beschrieben [223], in Bezug auf andere Marker wie auch DHB gibt es dazu in der verwendeten Literatur keine Angaben. Dieses könnte einerseits erklären, warum der Anstieg der IPG $\text{F}_{2\alpha}$ -Messwerte direkt nach einem Tauchgang bei Berufstauchern als Probandenkollektiv geringer ausfällt als bei den DHB, andererseits kann dieses ein Hinweis auf eine bessere Robustheit der dihydroxylierten Benzoate als Marker des oxidativen Stresses im Vergleich zu IPG $\text{F}_{2\alpha}$ sein.

Die in der Literatur beschriebene Adaption von Tauchern an oxidativen Stress [223] könnte in einem Zusammenhang mit dem in dieser Arbeit ermittelten Anteil von Isoprostan-Nonrespondern stehen. Unter hyperbar-hyperoxischen Bedingungen sollten theoretisch verstärkt Isofurane anstelle von Isoprostanen gebildet werden (s. unter 7.3). An Tauchern wurde noch nie untersucht, ob die möglichen Isoprostan-Nonresponder eine besonders starke Produktion von Isofuranen zeigen und der Organismus hier auf einen anderen metabolischen Weg ausweicht. Dieses könnte ein Teil des Adaptionseffektes von Tauchern an erhöhte Sauerstoffbelastungen sein [223], da mit Hilfe von Isofuranen mehr Sauerstoffmoleküle als mit Isoprostanen gebunden und metabolisiert werden können (s. Abb. 7.14 auf der nächsten Seite). Hierdurch würde sich sowohl der Anteil von Isoprostan-Nonrespondern wie auch die im Vergleich zu dihydroxylierten Benzoaten geringere Steigerungsrate bezogen auf Creatinin erklären lassen.

Sauerstoffabhängigkeit und Limitierungen der Isoprostanbildung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine Korrelation zwischen dem Anstieg der IPG $\text{F}_{2\alpha}$ -Werte in Urinproben von Tauchern direkt nach einem Tauchgang mit der dabei bestehenden Sauerstoffbelastung durchgeführt. Dabei wurde eine Erhöhung der IPG $\text{F}_{2\alpha}$ -Werte pro Creatinin von +10 % im Mittel (+6 % im Median) (bei dem Isomer 15(R)-IPG $\text{F}_{2\alpha}$ um +4 % im Mittel bzw. +1 % im Median) ermittelt (s. unter 6.11.3 auf Seite 116 bzw. 6.12.1 auf Seite 120).

Eine Abhängigkeit und Modulation von Markern des oxidativen Stresses bei unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen ist bekannt und wird in der Literatur beschrieben. Isoprostane gelten als relativ insensitive Marker des oxidativen Stresses unter hoher Sauerstoffbelastung [20]. Die Lipidperoxidation kann auch zur Bildung von Substanzen mit einer Tetrahydrofuran-Partialstruktur führen, den sogenannten Isofuranen [239–242]. Die Gruppe der Isofurane besteht aus acht Regiomerklassen mit jeweils 16 racemischen Diastereomerenpaaren, insgesamt also 256 Isomeren [239]. Der Metabolismus der Isofurane wurde bisher nicht weiter untersucht, aufwändige quantitative Messverfahren sind in der Literatur beschrieben [119].

Der Sauerstoffgehalt moduliert die Bildung von Isoprostanen und Isofuranen unterschiedlich, bei höherer Sauerstoffkonzentration wird die Bildung von Isofuranen bevorzugt (s. Abb. 7.14 auf der nächsten Seite). Die Bildung von Isoprostanen erhöht sich mit steigendem Sauerstoffgehalt, allerdings nur bis zu 21 % Sauerstoffanteil [73, 243]. Bei einer höheren Sauerstoffkonzentration gibt es keine weitere Erhöhung der Isoprostanwerte, die Isofurane hingegen steigen bis zu einem Gehalt von 100 % Sauerstoff weiter an. Daher könnte bei einem erhöhten Sauerstoffniveau die Messung von Isofuranen zur Bestimmung des oxidativen Stresses potentiell ein sensitiveres Verfahren sein als die Messung von Isoprostanen. [44, 118, 239, 240, 242]

Ein hoher Sauerstoffgehalt (über 21 %) begünstigt die Bildung von Isofuranen. Da diese Substanzklasse im Vergleich zu Isoprostanen mehr Sauerstoff beinhaltet, kann dieser über die Bindung in Isofuranen effektiver unschädlich gemacht werden als durch die Bildung der weniger sauerstoffhaltigen Isoprostane [244]. Dieses könnte auf Isoprostane und vor allem Isofurane als einen Entgiftungsmechanismus des Körpers im Umgang mit einer hohen Sauerstofflast hinweisen.

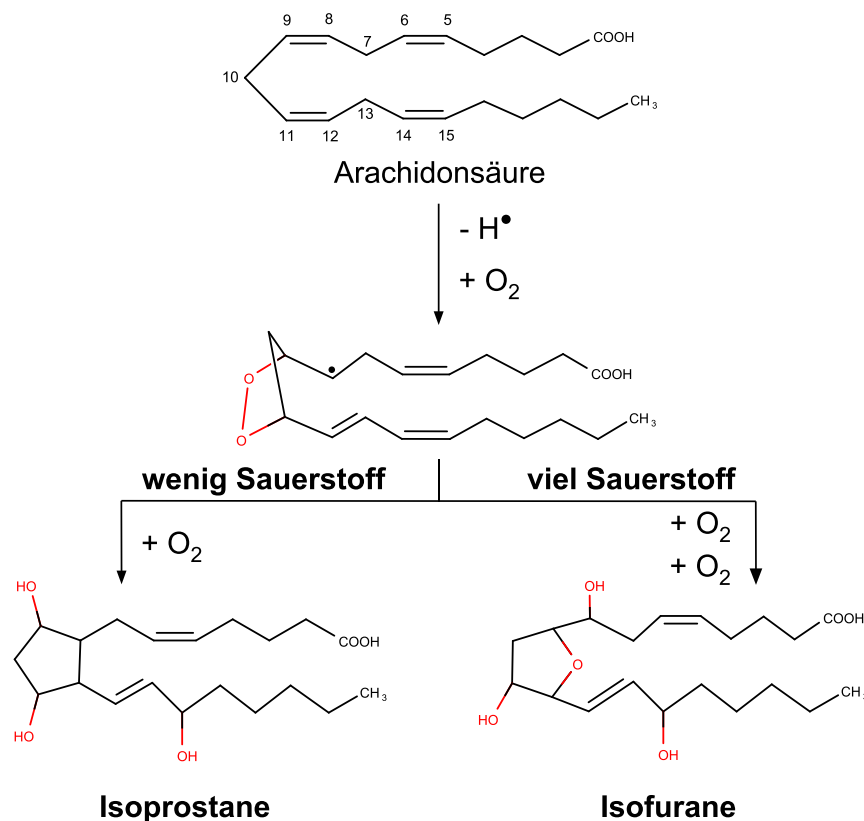


Abb. 7.14.: Darstellung der Abhängigkeit einer Isoprostanbildung von der Sauerstoffkonzentration; bei hohem Sauerstoffangebot werden verstärkt Isofurane gebildet.

Möglicherweise wären Isofurane aufgrund der Sauerstoffmodulation in einer Anwendung wie der Messung des oxidativen Stresses bei Tauchern ein sensitiverer Marker mit höherer Aussagekraft. Vielleicht wäre eine kombinierte Messung von Isoprostanen und Isofuranen (evtl. zusammen mit den jeweiligen Hauptmetaboliten) der beste Weg um oxidativen Stress unter möglichst allen Umgebungsbedingungen akkurat messen zu können. Allerdings fehlt es aktuell an Erfahrung in der Messung von Isofuranen und an kommerziell verfügbaren Standardsubstanzen sowie isopenmarkierten internen Standards.

Die Erstbeschreibung der Isoprostane wurde 1990 veröffentlicht, also vor etwa 30 Jahren. Bereits bis 2015 wurden über 3800 Artikel zu dieser noch jungen Substanzklasse publiziert [119]. Mittlerweile werden nicht-enzymatisch gebildete cyclische Lipid-Derivate als wichtige eigenständige Naturstoffklasse mit vielfältigen biochemischen Wirkungen angesehen [73]. Innerhalb weniger Jahre gelang den Isoprostanen der Aufstieg von einer kuriosen Beobachtung [20] zum Goldstandard der Messung des oxidativen Stresses *in vivo* [51, 80, 156, 205]. Dennoch bleibt zu beachten, dass mit der Messung von Isoprostanen streng genommen das Ausmaß der Arachidonsäureperoxidation und nicht die oxidative Schädigung des gesamten Lipidpools erfasst wird [28]. Ein Großteil des gegenwärtigen Wissens über Isoprostane stammt aus Untersuchungen über das am besten untersuchte Isomer IPG F_{2α} und ist daher größtenteils auf diesen Analyten limitiert.

8. Zusammenfassung

Eine Missregulation zwischen oxidativen Prozessen und antioxidativer Abwehr kann im Organismus zu oxidativem Stress führen. Durch nicht-enzymatische oxidative Vorgänge können dabei aus Arachidonsäure Isoprostane gebildet werden. Isoprostane sind eine Gruppe von stabilen sauerstoffhaltigen Produkten des Lipidstoffwechsels mit potentiell vielen isomeren Verbindungen. Die große Anzahl der möglichen Isomere und die geringen gebildeten Mengen erschweren die Bestimmung der Zielverbindung IPG $F_{2\alpha}$, welche als Markersubstanz in biologischen Matrices und Gold-Standard der Analytik des oxidativen Stresses *in vivo* gilt. Die vorliegende Arbeit sollte die Frage klären, ob bei Tauchern als Modell zur Erzeugung von oxidativem Stress eine Veränderung der IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen in Urin vor und nach Tauchgängen mit der dadurch erfolgten Sauerstoffbelastung auftrat.

Akute Veränderungen von IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen durch einen Tauchgang sind bisher nicht ausreichend untersucht worden. Es gibt Studien über langfristige Adaptionseffekte an erhöhten oxidativen Stress bei Tauchern, kurzfristige Veränderungen von IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen sind für dieses Kollektiv noch nie untersucht worden. In der verfügbaren Literatur sind keine selektiven Quantifizierungen von IPG $F_{2\alpha}$ aus Urin von Tauchern mittels LC-MS/MS publiziert worden.

Zur Prüfung der Fragestellung musste zuerst eine Methode etabliert werden, mit der die in Urinen aufgrund von Verdünnungseffekten durch den Tauchvorgang vermuteten geringen Konzentrationen des Zielanalyten IPG $F_{2\alpha}$ zuverlässig messbar waren. Aufgrund der rechnerischen Korrektur durch die Urinkonzentrationen in Form eines Creatininquotienten konnten auch geringe Veränderungen der Messwerte zu deutlichen Unterschieden führen, so dass die Methode auch kleine Unterschiede der IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationen präzise ermitteln können musste.

Aus der zur Verfügung stehenden Gerätetechnik war LC-MS/MS die Messmethode der Wahl. Sie bot den Vorteil einer einfachen Probenvorbereitung, da beispielsweise fehleranfällige Derivatisierungen nicht nötig waren. Zusätzlich konnte eine Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS) als potentiell orthogonale Selektivitätskomponente zu LC und MS/MS evaluiert werden. Das dabei verwendete Verfahren der Quantifizierung von IPG $F_{2\alpha}$ aus Urin mit Hilfe eines kommerziellen DMS-Moduls (SelexION) wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

Durch Vorversuche mit dem SelexION wurde gezeigt, dass von den verfügbaren Referenzsubstanzen lediglich die zwei Isomere IPG $F_{2\alpha}$ und 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ nicht selektiv voneinander erfasst werden konnten und hier eine chromatographische Trennung nötig wurde. Da nur zwei Isomere chromatographisch zu trennen waren, wurde auf einer kurzen Säule mit einer schnellen Methode gearbeitet. Die chromatographische Methode wurde zunächst mit alkalischen Fließmitteln etabliert, da die Signale unter basischen Bedingungen stärker waren. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Retention nicht stabil und daher keine zuverlässige Chromatographie möglich war. Ein Wechsel zu Fließmitteln mit Säurezusatz konnte dieses Problem dauerhaft beheben.

Zur Isolierung von IPG $F_{2\alpha}$ aus Urin wurden zunächst Festphasenextraktionsverfahren (SPE) in Betracht gezogen, da die meisten in der Literatur beschriebenen Methoden mit dieser Extraktionsart gearbeitet haben. Da SPE-Methoden üblicherweise mit einer Aufkonzentrierung nach einer Evaporation enden, wurde die Möglichkeit von Verlusten durch Abdampfen unter Stickstoff evaluiert. Es ergaben sich bei der Evaporation Verluste von bis zu -48 %, welche aber durch entsprechende Maßnahmen einfach kompensiert werden konnten. Danach wurden zwei unterschiedliche SPE-Methoden entwickelt (Umkehrphase und Mixed-Mode). Dadurch sollte verglichen werden, ob eine einfache Umkehrphase oder die komplexere, aber der Theorie nach deutlich stärkere, Aufreinigung mit Hilfe einer Mixed-Mode-Phase Vorteile gegenüber der anderen Variante ergab. Beide SPE-Verfahren

zeigten in der Anwendung mit Realmatrix zwar eine hohe Extraktionseffizienz, aber gleichzeitig auch eine starke Ionensuppression von bis zu -62 %. Dieser starke Matrixeffekt wurde bereits erreicht, ohne die per SPE aufgereinigten Extrakte weiter zu konzentrieren. Es war daher fraglich, ob die in den Proben der Taucher vermuteten geringen Konzentrationen von IPG F_{2α} zuverlässig messbar waren.

Daher wurde zur Extraktion eine Festphasen-unterstützte Flüssigextraktion (SLE) als einfache Alternative evaluiert. Verfahren mittels Flüssig-Flüssig-Extraktionen (LLE) wurden in der verfügbaren Literatur zur Extraktion von IPG F_{2α} beschrieben, SLE war eine einfache Variante einer LLE und wurde daher bevorzugt. Ähnlich wie bei der SPE ergab sich auch hier in der Realanwendung trotz einer hohen Extraktionseffizienz bei Urin ein sehr hoher Matrixeffekt von bis zu -62 %, ebenfalls auch schon ohne eine weitere Aufkonzentrierung der Extrakte. Auch hier war zweifelhaft, ob die in den Taucherproben vermuteten geringen Konzentrationen von IPG F_{2α} zuverlässig messbar waren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Extraktionsarten speziell für die Matrix Urin erarbeitet und geprüft. Darunter waren als sehr selektiv geltende Verfahren wie Mixed-Mode-SPE, welche besonders saubere Extrakte mit wenig Ionensuppression in der LC-MS/MS ergeben sollen. Da die Matrixeffekte bei allen Verfahren sehr hoch ausgefallen waren, lag die Vermutung nahe, dass die Problematik der Ionensuppression nicht über eine verbesserte Extraktion gelöst werden konnte. Als eine Alternative zur Verringerung von Matrixeffekten wurde eine Veränderung der Chromatographie versucht, um eine bessere Abtrennung der supprimierend wirkenden Matrixbestandteile zu erreichen. Gleichzeitig wurde eine Direktinjektion der Matrix nach einer Verdünnung (Dilute & Shoot) evaluiert, da gemäß der verfügbaren Literatur Extraktionsarten wie SPE die supprimierend wirkenden Matrixbestandteile aufkonzentrieren können und eine einfache Verdünnung der Proben vorteilhaft sei.

Daher wurde der Dilute & Shoot-Ansatz weiter verfolgt, ein in klinisch-chemischen Laboren übliches Verfahren der LC-MS/MS-Analytik. Die Analysenmethode wurde entsprechend abgeändert, um eine stärkere Retention und damit eine bessere Abtrennung der Matrix zu erzeugen. Dazu wurde vorwiegend die Länge der analytischen Säule erhöht und aufgrund der Selektivität das Fließmittel Methanol gegen Acetonitril getauscht. Um einer Peakverbreiterung aufgrund der längeren Laufzeit der Methode entgegen zu wirken, wurde ein leichter Gradient verwendet, an dem nur wenige Justierungen nötig waren. Mit dieser veränderten Methode konnte in Vorversuchen ohne eine aufwändige und durch viele Schritte potentiell fehleranfällige Extraktion in jeder Urinprobe ein deutliches Signal des Zielanalyten IPG F_{2α} auf endogenem Niveau gemessen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde mit der Validierung der Dilute & Shoot LC-DMS-MS/MS-Methode begonnen. Durch die hohe Sensitivität des Verfahrens stand keine Real-Leermatrix zur Verfügung, insofern mussten einige Versuche angepasst bzw. Validierungsverfahren gewählt werden, die mit endogen gebildeten Substanzen durchführbar waren. Im Rahmen der Validierung wurden die Einstellungen des SeleXION-Moduls aufwändig überprüft und getestet. Dabei konnte bestätigt werden, dass ein DMS-Modul in der praktischen Anwendung einer Isoprostananalytik aus Urin die Selektivität des Systems erhöhte und bis auf die Isomere IPG F_{2α} und 15(R)-IPG F_{2α} alle anderen Signale herausfiltern konnte. Gemäß der Validierung konnte das Messverfahren bezüglich Stabilität, Selektivität, Linearität, Präzision, Richtigkeit, Grenzwerte der Methode und Verschleppung überzeugen und für die Messung von Urinproben verwendet werden. Die Untersuchung der Matrixeffekte im Rahmen der Validierung zeigte dabei Suppressionen in konzentrierten Urinen von bis zu -20 %, in unphysiologisch hoch konzentrierten Proben bis zu -43 %. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass der zur Messung verwendete interne Standard in der Lage war, diese Matrixeffekte effektiv zu kompensieren.

Die Anwendung der validierten Methode an Taucherurinen vor und nach Tauchgängen bei insgesamt n = 234 Proben zeigte, dass die IPG F_{2α}-Konzentration pro Creatinin im Median direkt nach einem Tauchgang um + 6% (Mittel + 10%) statistisch signifikant erhöht war im Vergleich zum Ausgangswert vor der körperlichen Belastung unter Sauerstoffexposition. Zum ersten Mal wurde die Erhöhung der IPG F_{2α}-Konzentration pro Creatinin mit der dafür verantwortlichen Sauerstoffbelastung korreliert. Dabei zeigte sich eine signifikante Abhängigkeit und ein Anstieg im Median von +17 % (Mittel

+24 %) direkt nach einem Tauchgang.

Da in jeder Probe ($n = 234$) das Isomer 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ messbar war, wurde dieses als potentieller Alternativmarker des oxidativen Stresses evaluiert. Hier zeigte sich ein nicht signifikanter Anstieg der Konzentration pro Creatinin von +1 % im Median (Mittel +4 %) nach einem Tauchgang im Vergleich zum Wert vorher. Insgesamt war das Isomer 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ ein weniger sensibler Marker des oxidativen Stresses als der Zielanalyt IPG $F_{2\alpha}$. Die auch hier zum ersten Mal durchgeführte Korrelation der 15(R)-IPG $F_{2\alpha}$ -Konzentrationserhöhung pro Creatinin mit der Sauerstoffbelastung zeigte einen Anstieg im Median von +14 % (Mittel +25 %) direkt nach einem Tauchgang.

Abschließend wurde ein Methodenvergleich durchgeführt, in welchem Messungen derselben Taucherurine mit und ohne Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS) durchgeführt wurden (LC-DMS-MS/MS vs. LC-MS/MS). Hier sollte geprüft werden, ob die für diese Arbeit etablierte Methode auch ohne SelexION und damit auch für Labore mit LC-MS/MS-Systemen ohne DMS-Modul verwendbar war. Der Vergleich zeigte, dass es durch die Verwendung eines SelexION zu +3 % höheren IPG $F_{2\alpha}$ -Messwerten kam. Der Unterschied war statistisch signifikant, aber für die praktische Anwendung nicht relevant. Das Verfahren konnte insbesondere für einen Vorher-Nachher-Vergleich von Proben desselben Individuums auch ohne DMS-Zusatzausrüstung verwendet werden. Dennoch konnte das SelexION in den Messreihen zeigen, dass es durch die höhere Selektivität zu einer deutlichen Bereinigung der Chromatogramme von Zusatzsignalen kam. Das Signal-Rauschverhältnis (S/N) verbesserte sich um einen Faktor von 3,5 im Vergleich zu Messungen ohne Differentielle Mobilitätsspektrometrie (DMS). Dieses erleichterte die Integration und Auswertung der Messwerte deutlich.

A. Anhang: LC-DMS-MS/MS-Methoden

A.1. Tuning-Parameter

Tab. A.1.: Tuning-Parameter

Parameter	Einstellung
Ionenquelle	Elektrospray (ESI)
Polarität	negativ
Curtain Gas (CUR)	20 psi
Ion Spray Voltage (IS)	-4500 V
Temperatur (TEM)	ohne
Nebulizer Gas (GS 1)	14 psi
Heater Gas (GS 2)	0 psi
Infusionsgeschwindigkeit	7 µL/min
Declustering Potential (DP)	-100 V
Entrance Potential (EP)	-10 V
Cell Exit Potential (CXP)	-16 V
DMS-Modul SelexION	ohne

A.2. Methode 1 - generische Einstellungen

Tab. A.2.: LC-MS/MS Parameter Methode 1

Parameter	Einstellung					
LC-Parameter						
Fließmittel A	Wasser + diverse Modifier					
Fließmittel B	Methanol + diverse Modifier					
Gradient	Zeit [min]	FM B [%]				
	0	10				
	3	100				
	4	100				
	4,1	10				
	5	10				
Flussrate	300 µL/min					
Temperatur	40 °C					
Injektionsvolumen	5 µL					
Säule	ACE UltraCore SuperC18 50x2,1 mm (2,5 µm)					
Autosampler-Kühlung	10 °C					
globale MS-Parameter						
Ionenquelle	Elektrospray (ESI)					
Polarität	negativ					
Curtain Gas (CUR)	40 psi					
Collision Gas (CAD)	medium					
Ion Spray Voltage (IS)	-4500 V					
Temperatur (TEM)	600 °C					
Nebulizer Gas (GS 1)	60 psi					
Heater Gas (GS 2)	60 psi					
Entrance Potential (EP)	-10 V					
Auflösung Q1 / Q3	unit / unit					
SelexION	off (transparent mode)					
DMS Temperature (DT)	low (150 °C)					
MRM-Parameter						
Precursor Ion	IPG F _{2α}			IPG F _{2α} -D4		
	m/z 353			m/z 357		
Declustering Potential (DP)	-110 V			-130 V		
	m/z	CE [V]	CXP [V]	m/z	CE [V]	CXP [V]
Product Ions	309	-28	-21	313	-28	-15
	291	-28	-13	295	-30	-25
	247	-32	-21	251	-34	-19
	193	-34	-15	197	-36	-15
	43	-72	-7	43	-78	-7
Dwell Time je MRM	50 ms			50 ms		

A.3. Methode 2 - alkalisches Fließmittel

Tab. A.3.: LC-MS/MS Parameter Methode 2

Parameter	Einstellung														
LC-Parameter															
Fließmittel A	0,02 % (v/v) Ammoniaklösung in Wasser														
Fließmittel B	Methanol + 0,02 % (v/v) Ammoniaklösung														
Gradient	<table> <tr> <th>Zeit [min]</th><th>FM B [%]</th></tr> <tr> <td>0</td><td>30</td></tr> <tr> <td>3</td><td>30</td></tr> <tr> <td>4</td><td>100</td></tr> <tr> <td>6</td><td>100</td></tr> <tr> <td>6,5</td><td>30</td></tr> <tr> <td>8</td><td>30</td></tr> </table>	Zeit [min]	FM B [%]	0	30	3	30	4	100	6	100	6,5	30	8	30
Zeit [min]	FM B [%]														
0	30														
3	30														
4	100														
6	100														
6,5	30														
8	30														
Flussrate	400 µL/min														
Temperatur	50 °C														
Injektionsvolumen	5 µL bis max. 50 µL														
Säule	ACE UltraCore SuperC18 50x2,1 mm (2,5 µm)														
Autosampler-Kühlung	10 °C														
globale MS-Parameter															
Ionenquelle	Elektrospray (ESI)														
Polarität	negativ														
Curtain Gas (CUR)	40 psi														
Collision Gas (CAD)	medium														
Ion Spray Voltage (IS)	-4000 V														
Temperatur (TEM)	700 °C														
Nebulizer Gas (GS 1)	40 psi														
Heater Gas (GS 2)	60 psi														
Entrance Potential (EP)	-10 V														
Auflösung Q1 / Q3	unit / unit														
DMS-Einstellungen															
DMS-Temperatur (DT) low (150 °C)															
SelexION	off (transparent mode) oder														
Parameter	Einstellung														
Modifier (MD)	none														
Separation Voltage (SV)	4000 V														
Compensation Voltage (COV)	8,5 V														
DMS-Offset (DMO)	3 V														
DMS-Resolution (DR)	off														

Tab. A.3.: LC-MS/MS Parameter Methode 2

Parameter	Einstellung					
	MRM-Parameter					
Precursor Ion Declustering Potential (DP)	IPG F _{2α}			IPG F _{2α} -D4		
	m/z 353			m/z 357		
	-110 V			-130 V		
	m/z	CE [V]	CXP [V]	m/z	CE [V]	CXP [V]
Product Ions	309	-28	-21	313	-28	-15
	291	-28	-13	295	-30	-25
	247	-32	-21	251	-34	-19
	193	-34	-15	197	-36	-15
	43	-72	-7	43	-78	-7
Dwell Time je MRM	50 ms			50 ms		

A.4. Methode 3 - saures Fließmittel

Tab. A.4.: LC-MS/MS Parameter Methode 3

Parameter	Einstellung														
LC-Parameter															
Fließmittel A	0,1 % (v/v) Ameisensäure in Wasser														
Fließmittel B	Methanol + 0,1 % (v/v) Ameisensäure														
Gradient	<table> <tr> <th>Zeit [min]</th><th>FM B [%]</th></tr> <tr> <td>0</td><td>50</td></tr> <tr> <td>3</td><td>50</td></tr> <tr> <td>4</td><td>100</td></tr> <tr> <td>6</td><td>100</td></tr> <tr> <td>6,5</td><td>50</td></tr> <tr> <td>8</td><td>50</td></tr> </table>	Zeit [min]	FM B [%]	0	50	3	50	4	100	6	100	6,5	50	8	50
Zeit [min]	FM B [%]														
0	50														
3	50														
4	100														
6	100														
6,5	50														
8	50														
Flussrate	400 µL/min														
Temperatur	50 °C														
Injektionsvolumen	5 µL bis max. 50 µL														
Säule	ACE UltraCore SuperC18 50x2,1 mm (2,5 µm)														
Autosampler-Kühlung	10 °C														
globale MS-Parameter															
Ionenquelle	Elektrospray (ESI)														
Polarität	negativ														
Curtain Gas (CUR)	40 psi														
Collision Gas (CAD)	medium														
Ion Spray Voltage (IS)	-4000 V														
Temperatur (TEM)	700 °C														
Nebulizer Gas (GS 1)	40 psi														
Heater Gas (GS 2)	60 psi														
Entrance Potential (EP)	-10 V														
Auflösung Q1 / Q3	unit / unit														
DMS-Einstellungen															
DMS-Temperatur (DT) low (150 °C)															
SelexION	off (transparent mode) oder														
Parameter	Einstellung														
Modifier (MD)	none														
Separation Voltage (SV)	4000 V														
Compensation Voltage (COV)	9,0 V														
DMS-Offset (DMO)	3 V														
DMS-Resolution (DR)	off														

Tab. A.4.: LC-MS/MS Parameter Methode 3

Parameter	Einstellung					
MRM-Parameter						
Precursor Ion Declustering Potential (DP)	IPG F _{2α}			IPG F _{2α} -D4		
	m/z 353			m/z 357		
Product Ions	-110 V			-130 V		
	m/z	CE [V]	CXP [V]	m/z	CE [V]	CXP [V]
	309	-28	-21	313	-28	-15
	291	-28	-13	295	-30	-25
	247	-32	-21	251	-34	-19
	193	-34	-15	197	-36	-15
Dwell Time je MRM	43	-72	-7	43	-78	-7
	50 ms			50 ms		

A.5. Methode 4 - Dilute & Shoot

Tab. A.5.: LC-MS/MS Parameter Methode 4

Parameter	Einstellung														
LC-Parameter															
Fließmittel A	0,01 % (v/v) Ameisensäure in Wasser														
Fließmittel B	Acetonitril + 0,01 % (v/v) Ameisensäure														
Gradient	<table> <tr> <th>Zeit [min]</th><th>FM B [%]</th></tr> <tr> <td>0</td><td>20</td></tr> <tr> <td>15</td><td>29</td></tr> <tr> <td>16</td><td>100</td></tr> <tr> <td>18</td><td>100</td></tr> <tr> <td>18,1</td><td>20</td></tr> <tr> <td>20</td><td>20</td></tr> </table>	Zeit [min]	FM B [%]	0	20	15	29	16	100	18	100	18,1	20	20	20
Zeit [min]	FM B [%]														
0	20														
15	29														
16	100														
18	100														
18,1	20														
20	20														
Flussrate	400 µL/min														
Temperatur	30 °C														
Injektionsvolumen	20 µL (1 - 50 µL getestet)														
Säule	ACE UltraCore SuperC18 150x2,1 mm (2,5 µm)														
Autosampler-Kühlung	10 °C														
globale MS-Parameter															
Ionenquelle	Elektrospray (ESI)														
Polarität	negativ														
Curtain Gas (CUR)	20 psi														
Collision Gas (CAD)	medium														
Ion Spray Voltage (IS)	-4000 V														
Temperatur (TEM)	700 °C														
Nebulizer Gas (GS 1)	40 psi														
Heater Gas (GS 2)	60 psi														
Entrance Potential (EP)	-10 V														
Resolution Q1 / Q3	unit / unit														
DMS-Einstellungen															
SelexION	<table> <tr> <th>Parameter</th><th>Einstellung</th></tr> <tr> <td>DMS-Temperatur (DT)</td><td>low (150 °C)</td></tr> <tr> <td>Modifier (MD)</td><td>none</td></tr> <tr> <td>Separation Voltage (SV)</td><td>4000 V</td></tr> <tr> <td>Compensation Voltage (COV)</td><td>9,0 V</td></tr> <tr> <td>DMS-Offset (DMO)</td><td>3 V</td></tr> <tr> <td>DMS-Resolution (DR)</td><td>off</td></tr> </table>	Parameter	Einstellung	DMS-Temperatur (DT)	low (150 °C)	Modifier (MD)	none	Separation Voltage (SV)	4000 V	Compensation Voltage (COV)	9,0 V	DMS-Offset (DMO)	3 V	DMS-Resolution (DR)	off
Parameter	Einstellung														
DMS-Temperatur (DT)	low (150 °C)														
Modifier (MD)	none														
Separation Voltage (SV)	4000 V														
Compensation Voltage (COV)	9,0 V														
DMS-Offset (DMO)	3 V														
DMS-Resolution (DR)	off														

Tab. A.5.: LC-MS/MS Parameter Methode 4

Parameter	Einstellung					
	MRM-Parameter					
	IPG F _{2α}			IPG F _{2α} -D4		
Precursor Ion	m/z 353			m/z 357		
Declustering Potential (DP)	-110 V			-130 V		
Product Ion	m/z	CE [V]	CXP [V]	m/z	CE [V]	CXP [V]
	193	-34	-15	197	-36	-15
Dwell Time	500 ms			250 ms		

Literaturverzeichnis

- [1] GRONOW, Gernot ; KÄHLER, Wataru ; KOCH, Andreas ; KLAUSE, Norbert: Benzoate Hydroxylation: A measure of oxidative stress in divers. In: OKUNIEFF P., Chen Y. Williams J. J. Williams J. (Hrsg.): *Oxygen Transport to Tissue XXVI. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 566. Springer, 2005, S. 223–229
- [2] KÄHLER, W ; KOCH, I ; WOHLRAB, C ; KOWALSKI, J ; WITTE, J ; KOCH, A: Influence of hyperoxia and physical exercise on OH-radical stress in humans as measured by dihydroxylated benzoates (DHB) in urine. In: *Undersea & Hyperbaric Medicine* 40 (2013), Nr. 3, S. 231–238
- [3] MORROW, J. D. ; HILL, K. E. ; BURK, R. F. ; NAMMOUR, T. M. ; BADR, K. F. ; ROBERTS, L. J.: A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990), S. 9383–9387
- [4] CRACOWSKI, Jean-Luc ; ORMEZZANO, Olivier: Isoprostanes, emerging biomarkers and potential mediators in cardiovascular diseases. In: *Eur Heart J* 25 (2004), S. 1675–1678
- [5] ELSTNER, Erich F. ; BORS, Wolf: *Reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin*. Springer-Verlag, 1987
- [6] ELSTNER, Erich F.: *Der Sauerstoff - Biochemie, Biologie, Medizin*. BI-Wissenschaftsverlag, 1990
- [7] TURRENS, Julio F.: Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. In: *Bioscience Reports* 17 (1997), Nr. 1, S. 3–8
- [8] TURRENS, Julio F.: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. In: *J Physiol* 552 (2003), Nr. 2, S. 335–344
- [9] HAFNER, Sebastian ; BELONCLE, François ; KOCH, Andreas ; RADERMACHER, Peter ; ASFAR, Pierre: Hyperoxia in intensive care, emergency, and peri-operative medicine: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? A 2015 update. In: *Ann Intensive Care* 5 (2015), S. 42
- [10] COMPORTI, Mario ; SIGNORINI, Cinzia ; AREZZINI, Beatrice ; VECCHIO, Daniela ; MONACO, Barbara ; GARDI, Concetta: F₂-isoprostanes are not just markers of oxidative stress. In: *Free Radic Biol Med* 44 (2008), S. 247–256
- [11] MONAGHAN, Pat ; METCALFE, Neil B. ; TORRES, Roxana: Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. In: *Ecol Lett* 12 (2009), S. 75–92
- [12] RIMBACH, G. ; HÖHLER, D. ; FISCHER, A. ; ROY, S. ; VIRGILI, F. ; PALLAUF, J. ; PACKER, L.: Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. In: *Arch Tierernähr* 52 (1999), S. 203–222
- [13] SIES, Helmut: Oxidative stress: from basic research to clinical application. In: *Am J Med* 91 (1991), Nr. 3C, S. 31–38
- [14] LUNDGREN, Camilla A. K. ; SJÖSTRAND, Dan ; BINER, Olivier ; BENNETT, Matthew ; RUDLING, Axel ; JOHANSSON, Ann-Louise ; BRZEZINSKI, Peter ; CARLSSON, Jens ; BALLMOOS, Christoph von ; HÖGBOM, Martin: Scavenging of superoxide by a membrane-bound superoxide oxidase. In: *Nat Chem Biol* 14 (2018), Nr. 8, S. 788–793
- [15] HALLIWELL, Barry ; GUTTERIDGE, John M.: *Free radicals in biology and medicine*, 2nd Edition. Clarendon Press, 1989

- [16] HALLIWELL, Barry ; GUTTERIDGE, John M.: *Free radicals in biology and medicine*, 5th Edition. Oxford University Press, 2015
- [17] GIUSTARINI, Daniela ; DALLE-DONNE, Isabella ; TSIKAS, Dimitrios ; ROSSI, Ranieri: Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. In: *Crit Rev Clin Lab Sci* 46 (2009), Nr. 5-6, S. 241–281
- [18] SIES, Helmut: *Oxidative Stress*. Academic Press, 1985
- [19] SIES, Helmut: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. In: *Exp Physiol* 82 (1997), S. 291–295
- [20] MONTUSCHI, Paolo ; BARNES, Peter J. ; ROBERTS, L. J.: Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. In: *FASEB J* 18 (2004), S. 1791–1800
- [21] SIES, Helmut: *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, 1991
- [22] ROBERTS, L. J. ; MORROW, J. D.: The generation and actions of isoprostanes. In: *Biochim Biophys Acta* 1345 (1997), S. 121–135
- [23] BASU, Samar ; HELMERSSON, Johanna: Factors regulating isoprostane formation in vivo. In: *Antioxid Redox Signal* 7 (2005), Nr. 1-2, S. 221–235
- [24] WARD, Walter F. ; QI, Wenbo ; REMMEN, Holly V. ; ZACKERT, William E. ; ROBERTS, L. J. ; RICHARDSON, Arlan: Effects of Age and Caloric Restriction on Lipid Peroxidation: Measurement of Oxidative Stress by F2-Isoprostane Levels. In: *Journal of Gerontology* 60A (2005), Nr. 7, S. 847–851
- [25] DALLE-DONNE, Isabella ; ROSSI, Ranieri ; COLOMBO, Roberto ; GIUSTARINI, Daniela ; MILZANI, Aldo: Biomarkers of oxidative damage in human disease. In: *Clin Chem* 52 (2006), Nr. 4, S. 601–623
- [26] BAUER, Jochen ; RIPPERGER, Anne ; FRANTZ, Stefan ; ERGÜN, Süleyman ; SCHWEDHELM, Edzard ; BENNDORF, Ralf A.: Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: implications of isoprostane-mediated thromboxane A2 receptor activation. In: *Br J Pharmacol* 171 (2014), S. 3115–3131
- [27] KLEIN, T. ; NEUHAUS, K. ; REUTTER, F. ; NÜSING, R. M.: Generation of 8-epi-prostaglandin F2 α in isolated rat kidney glomeruli by a radical-independent mechanism. In: *Br J Pharmacol* 133 (2001), S. 643–650
- [28] BASU, S.: The enigma of in vivo oxidative stress assessment: isoprostanes as an emerging target. In: *Scandinavian Journal of Food & Nutrition* 51 (2007), Nr. 2, S. 48–61
- [29] NOUROOZ-ZADEH, Jaffar: Key issues in F2-isoprostane analysis. In: *Biochem Soc Trans* 36 (2008), Nr. Pt 5, S. 1060–1065
- [30] HEINRICH, Peter C. ; MÜLLER, Matthias ; GRAEVE, Lutz: *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Auflage. Springer, 2014
- [31] BRANDES, Ralf ; LANG, Florian ; SCHMIDT, Robert F.: *Physiologie des Menschen*, 32. Auflage. Springer, 2019
- [32] FEIGENSPAN, Andreas: *Prinzipien der Physiologie*. Springer Spektrum, 2017
- [33] BOVERIS, A ; CHANCE, B: The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. In: *Biochem J* 134 (1973), S. 707–716
- [34] TURRENS, J F. ; FREEMAN, B A. ; CRAPO, J D.: Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 217 (1982), Nr. 2, S. 411–421
- [35] POWERS, Scott K. ; JACKSON, Malcolm J.: Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. In: *Physiol Rev* 88 (2008), S. 1243–1276
- [36] CAMPBELL, Peter T. ; GROSS, Myron D. ; POTTER, John D. ; SCHMITZ, Kathryn H. ; DUGGAN, Catherine ; MCTIERNAN, Anne ; ULRICH, Cornelia M.: Effect of exercise on oxidative stress: a 12-month randomized, controlled trial. In: *Med Sci Sports Exerc* 42 (2010), Nr. 8, S. 1448–1453

- [37] NIKOLAIDIS, Michalis G. ; KYPAROS, Antonios ; VRABAS, Ioannis S.: F2-isoprostane formation, measurement and interpretation: the role of exercise. In: *Prog Lipid Res* 50 (2011), S. 89–103
- [38] MEDINA, Sonia ; DOMÍNGUEZ-PERLES, Raul ; CEJUELA-ANTA, Roberto ; VILLANO, Débora ; MARTÍNEZ-SANZ, José M. ; GIL, Pilar ; GARCÍA-VIGUERA, Cristina ; FERRERES, Federico ; GIL, José I. ; GIL-IZQUIERDO, Angel: Assessment of oxidative stress markers and prostaglandins after chronic training of triathletes. In: *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 99 (2012), Nr. 3-4, S. 79–86
- [39] DEB, Sanjoy K. ; SWINTON, Paul A. ; DOLAN, Eimear: Nutritional considerations during prolonged exposure to a confined, hyperbaric, hyperoxic environment: recommendations for saturation divers. In: *Extrem Physiol Med* 5 (2016), Nr. 1
- [40] YIN, Huiyong ; PORTER, Ned A.: New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. In: *Antioxid Redox Signal* 7 (2005), Nr. 1-2, S. 170–184
- [41] YIN, Huiyong ; MORROW, Jason D. ; PORTER, Ned A.: Identification of a novel class of endoperoxides from arachidonate autoxidation. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Nr. 5, S. 3766–3776
- [42] GALANO, Jean-Marie ; LEE, Yiu Y. ; OGER, Camille ; VIGOR, Claire ; VERCAUTEREN, Joseph ; DURAND, Thierry ; GIERA, Martin ; LEE, Jetty Chung-Yung: Isoprostanes, neuroprostanes and phytprostanes: An overview of 25 years of research in chemistry and biology. In: *Progress in Lipid Research* 68 (2017), S. 83–108
- [43] MORROW, J. D. ; AWAD, J. A. ; BOSS, H. J. ; BLAIR, I. A. ; ROBERTS, L. J.: Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992), S. 10721–10725
- [44] DAVIES, S.S.: Lipidomic approaches to measuring isoprostanes and other markers of oxidative stress. In: *Eur J Lipid Sci Technol* 111 (2009), S. 64–74
- [45] PRATICO, Domenico: Prostanoid and isoprostanoid pathways in atherogenesis. In: *Atherosclerosis* 201 (2008), S. 8–16
- [46] YIN, Huiyong ; GAO, Ling ; TAI, Hsin-Hsiung ; MURPHEY, Laine J. ; PORTER, Ned A. ; MORROW, Jason D.: Urinary prostaglandin F2 α is generated from the isoprostane pathway and not the cyclooxygenase in humans. In: *J Biol Chem* 282 (2007), Nr. 1, S. 329–336
- [47] MORROW, J. D. ; HARRIS, T. M. ; ROBERTS, L. J.: Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. In: *Anal Biochem* 184 (1990), S. 1–10
- [48] MILNE, Ginger L. ; YIN, Huiyong ; MORROW, Jason D.: Human biochemistry of the isoprostane pathway. In: *J Biol Chem* 283 (2008), Nr. 23, S. 15533–15537
- [49] LAWSON, J. A. ; ROKACH, J. ; FITZGERALD, G. A.: Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Nr. 35, S. 24441–24444
- [50] ROBERTS, L. J. ; MORROW, J. D.: Measurement of F2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. In: *Free Radic Biol Med* 28 (2000), Nr. 4, S. 505–513
- [51] MILNE, Ginger L. ; MORROW, Jason D.: Isoprostanes and related compounds: update 2006. In: *Antioxid Redox Signal* 8 (2006), Nr. 7-8, S. 1379–1384
- [52] MORROW, Jason D.: The isoprostanes - unique products of arachidonate peroxidation: their role as mediators of oxidant stress. In: *Curr Pharm Des* 12 (2006), S. 895–902
- [53] NUGTEREN, D. H. ; VONKEMAN, H. ; DORP, D. A.: Non-enzymic conversion of all-cis 8,11,14-eicosatrienoic acid into prostaglandin E1. In: *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 86 (1967), S. 1237–1245
- [54] MORROW, J. D. ; ROBERTS, L. J.: The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. In: *Prog Lipid Res* 36 (1997), Nr. 1, S. 1–21
- [55] AWAD, J. A. ; MORROW, J. D. ; TAKAHASHI, K. ; ROBERTS, L. J.: Identification of non-cyclooxygenase-derived prostanoid (F2-isoprostane) metabolites in human urine and plasma. In: *J Biol Chem* 268 (1993), Nr. 6, S. 4161–4169

- [56] ROKACH, J. ; KHANAPURE, S. P. ; HWANG, S. W. ; ADIYAMAN, M. ; LAWSON, J. A. ; FITZGERALD, G. A.: Nomenclature of isoprostanes: a proposal. In: *Prostaglandins* 54 (1997), S. 853–873
- [57] TABER, D. F. ; MORROW, J. D. ; ROBERTS, L. J.: A nomenclature system for the isoprostanes. In: *Prostaglandins* 53 (1997), S. 63–67
- [58] ROBERTS, L. J. ; MORROW, J. D.: Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. In: *Cell Mol Life Sci* 59 (2002), S. 808–820
- [59] MUSIEK, Erik S. ; YIN, Huiyong ; MILNE, Ginger L. ; MORROW, Jason D.: Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway. In: *Lipids* 40 (2005), Nr. 10, S. 987–994
- [60] ROKACH, J. ; KHANAPURE, S. P. ; HWANG, S. W. ; ADIYAMAN, M. ; LAWSON, J. A. ; FITZGERALD, G. A.: The isoprostanes: a perspective. In: *Prostaglandins* 54 (1997), S. 823–851
- [61] YIN, Huiyong ; HAVRILLA, Christine M. ; GAO, Ling ; MORROW, Jason D. ; PORTER, Ned A.: Mechanisms for the formation of isoprostane endoperoxides from arachidonic acid. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 19, S. 16720–16725
- [62] MONTUSCHI, Paolo ; BARNES, Peter ; ROBERTS, L. J.: Insights into oxidative stress: the isoprostanes. In: *Curr Med Chem* 14 (2007), S. 703–717
- [63] MORROW, J. D. ; AWAD, J. A. ; WU, A. ; ZACKERT, W. E. ; DANIEL, V. C. ; ROBERTS, L. J.: Nonenzymatic free radical-catalyzed generation of thromboxane-like compounds (isothromboxanes) in vivo. In: *J Biol Chem* 271 (1996), Nr. 38, S. 23185–23190
- [64] CHEN, Y. ; MORROW, J. D. ; ROBERTS, L. J.: Formation of reactive cyclopentenone compounds in vivo as products of the isoprostane pathway. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Nr. 16, S. 10863–10868
- [65] WAUGH, R. J. ; MORROW, J. D. ; ROBERTS, L. J. ; MURPHY, R. C.: Identification and relative quantitation of F2-isoprostane regioisomers formed in vivo in the rat. In: *Free Radic Biol Med* 23 (1997), Nr. 6, S. 943–954
- [66] MORROW, J. D. ; ROBERTS, L. J.: The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. In: *Biochem Pharmacol* 51 (1996), S. 1–9
- [67] YIN, Huiyong ; PORTER, Ned A. ; MORROW, Jason D.: Separation and identification of F2-isoprostane regioisomers and diastereomers by novel liquid chromatographic/mass spectrometric methods. In: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 827 (2005), S. 157–164
- [68] YIN, Huiyong ; HAVRILLA, Christine M. ; MORROW, Jason D. ; PORTER, Ned A.: Formation of isoprostane bicyclic endoperoxides from the autoxidation of cholesteryl arachidonate. In: *J Am Chem Soc* 124 (2002), S. 7745–7754
- [69] YIN, Huiyong ; XU, Libin ; PORTER, Ned A.: Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. In: *Chem Rev* 111 (2011), S. 5944–5972
- [70] BOHNSTEDT, Kristina C. ; KARLBERG, Bo ; WAHLUND, Lars-Olof ; JÖNHAGEN, Maria E. ; BASUN, Hans ; SCHMIDT, Staffan: Determination of isoprostanes in urine samples from Alzheimer patients using porous graphitic carbon liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 796 (2003), S. 11–19
- [71] MORROW, J. D. ; ROBERTS, L. J.: Quantification of noncyclooxygenase derived prostanoids as a marker of oxidative stress. In: *Free Radic Biol Med* 10 (1991), S. 195–200
- [72] ROBERTS, L. J. ; MORROW, J. D.: The isoprostanes: novel markers of lipid peroxidation and potential mediators of oxidant injury. In: *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 23 (1995), S. 219–224
- [73] JAHN, Ullrich ; GALANO, Jean-Marie ; DURAND, Thierry: Beyond Prostaglandins - Chemistry and Biology of Cyclic Oxygenated Metabolites Formed by Free-Radical Pathways from Polyunsaturated Fatty Acids. In: *Angew Chem Int Ed* 47 (2008), S. 5894–5955

- [74] JAHN, Emanuela ; DURAND, Thierry ; GALANO, Jean-Marie ; JAHN, Ullrich: Recent Approaches to the Total Synthesis of Phytoprostanes, Isoprostanes and Neuroprostanes as Important Products of Lipid Oxidative Stress and Biomarkers of Disease. In: *Chem Listy* 108 (2014), S. 301–319
- [75] PRATICO, D. ; LAWSON, J. A. ; FITZGERALD, G. A.: Cyclooxygenase-dependent formation of the isoprostane, 8-epi prostaglandin F₂ α . In: *J Biol Chem* 270 (1995), Nr. 17, S. 9800–9808
- [76] KLEIN, T. ; REUTTER, F. ; SCHWEER, H. ; SEYBERTH, H. W. ; NÜSING, R. M.: Generation of the isoprostane 8-epi-prostaglandin F₂ α in vitro and in vivo via the cyclooxygenases. In: *J Pharmacol Exp Ther* 282 (1997), Nr. 3, S. 1658–1665
- [77] PRATICO, D. ; LAWSON, J. A. ; ROKACH, J. ; FITZGERALD, G. A.: The isoprostanes in biology and medicine. In: *Trends Endocrinol Metab* 12 (2001), Nr. 6, S. 243–247
- [78] CRACOWSKI, Jean-Luc ; DURAND, Thierry ; BESSARD, Germain: Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. In: *Trends Pharmacol Sci* 23 (2002), Nr. 8, S. 360–366
- [79] BASU, Samar: F₂-isoprostanes in human health and diseases: from molecular mechanisms to clinical implications. In: *Antioxid Redox Signal* 10 (2008), Nr. 8, S. 1405–1434
- [80] MORROW, J. D. ; ROBERTS, L. J.: Mass spectrometric quantification of F₂-isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidant stress. In: *Methods Enzymol* 300 (1999), S. 3–12
- [81] MOORE, K. ; ROBERTS, L. J.: Measurement of lipid peroxidation. In: *Free Radic Res* 28 (1998), S. 659–671
- [82] PRATICO, D.: F₂-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. In: *Atherosclerosis* 147 (1999), S. 1–10
- [83] MORROW, Jason D.: Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 (2005), S. 279–286
- [84] STAFFORINI, Diana M. ; SELLER, James R. ; BLACKWELL, Timothy S. ; SAPIRSTEIN, Adam ; YULL, Fiona E. ; MCINTYRE, Thomas M. ; BONVENTRE, Joseph V. ; PRESCOTT, Stephen M. ; ROBERTS, L. J.: Release of free F₂-isoprostanes from esterified phospholipids is catalyzed by intracellular and plasma platelet-activating factor acetylhydrolases. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Nr. 8, S. 4616–4623
- [85] HALLIWELL, Barry ; LEE, Chung Yung J.: Using isoprostanes as biomarkers of oxidative stress: some rarely considered issues. In: *Antioxid Redox Signal* 13 (2010), Nr. 2, S. 145–156
- [86] BANERJEE, M. ; KANG, K. H. ; MORROW, J. D. ; ROBERTS, L. J. ; NEWMAN, J. H.: Effects of a novel prostaglandin, 8-epi-PGF₂ α , in rabbit lung in situ. In: *Am J Physiol* 263 (1992), Nr. 3 Pt 2, S. H660–H663
- [87] JANSSEN, L. J.: Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280 (2001), S. 1067–1082
- [88] JANSSEN, Luke J.: The pulmonary biology of isoprostanes. In: *Chem Phys Lipids* 128 (2004), S. 101–116
- [89] JANSSEN, L. J.: Isoprostanes: generation, pharmacology, and roles in free-radical-mediated effects in the lung. In: *Pulm Pharmacol Ther* 13 (2000), S. 149–155
- [90] YIN, Huiyong: New techniques to detect oxidative stress markers: mass spectrometry-based methods to detect isoprostanes as the gold standard for oxidative stress in vivo. In: *Biofactors* 34 (2008), S. 109–124
- [91] THOMPSON, Henry J. ; HEIMENDINGER, Jerianne ; GILLETTE, Cynthia ; SEDLACEK, Scot M. ; HAEGELE, Albert ; O'NEILL, Caitlin ; WOLFE, Pamela: In vivo investigation of changes in biomarkers of oxidative stress induced by plant food rich diets. In: *J Agric Food Chem* 53 (2005), S. 6126–6132

- [92] MILNE, Ginger L. ; YIN, Huiyong ; HARDY, Klarissa D. ; DAVIES, Sean S. ; ROBERTS, L J.: Isoprostane generation and function. In: *Chem Rev* 111 (2011), S. 5973–5996
- [93] MONTINE, Kathleen S. ; QUINN, Joseph F. ; ZHANG, Jing ; FESSEL, Joshua P. ; ROBERTS, L. J. ; MORROW, Jason D. ; MONTINE, Thomas J.: Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. In: *Chem Phys Lipids* 128 (2004), S. 117–124
- [94] CRANKSHAW, DJ ; RANGACHARI, PK: Isoprostanes: more than just mere markers. In: *Molecular and Cellular Biochemistry* 253 (2003), S. 125–130
- [95] ROBERTS, L. J. ; MOORE, K. P. ; ZACKERT, W. E. ; OATES, J. A. ; MORROW, J. D.: Identification of the major urinary metabolite of the F2-isoprostane 8-iso-prostaglandin F2 α in humans. In: *J Biol Chem* 271 (1996), Nr. 34, S. 20617–20620
- [96] YAN, Zhao ; MAS, Emilie ; MORI, Trevor A. ; CROFT, Kevin D. ; BARDEN, Anne E.: A significant proportion of F2-isoprostanes in human urine are excreted as glucuronide conjugates. In: *Anal Biochem* 403 (2010), S. 126–128
- [97] SCHWEDHELM, Edzard ; BÖGER, Rainer H.: Application of gas chromatography-mass spectrometry for analysis of isoprostanes: their role in cardiovascular disease. In: *Clin Chem Lab Med* 41 (2003), Nr. 12, S. 1552–1561
- [98] MORI, T. A. ; CROFT, K. D. ; PUDDEY, I. B. ; BEILIN, L. J.: An improved method for the measurement of urinary and plasma F2-isoprostanes using gas chromatography-mass spectrometry. In: *Anal Biochem* 268 (1999), S. 117–125
- [99] OHASHI, N. ; YOSHIKAWA, M.: Rapid and sensitive quantification of 8-isoprostaglandin F2 α in human plasma and urine by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. In: *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 746 (2000), S. 17–24
- [100] LIANG, Yuanling ; WEI, Ping ; DUKE, Russell W. ; REAVEN, Peter D. ; HARMAN, S. M. ; CUTLER, Richard G. ; HEWARD, Christopher B.: Quantification of 8-iso-prostaglandin-F2 α and 2,3-dinor-8-iso-prostaglandin-F2 α in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *Free Radic Biol Med* 34 (2003), Nr. 4, S. 409–418
- [101] HASCHKE, Manuel ; ZHANG, Yan L. ; KAHLE, Christine ; KLAUITTER, Jelena ; KORECKA, Magdalena ; SHAW, Leslie M. ; CHRISTIANS, Uwe: HPLC-atmospheric pressure chemical ionization MS/MS for quantification of 15-F2t-isoprostane in human urine and plasma. In: *Clin Chem* 53 (2007), Nr. 3, S. 489–497
- [102] SAENDER, Amy K. ; LAHA, Thomas J. ; EDENFIELD, Michael J. ; SADRADEH, Sayed M H.: Quantification of urinary 8-iso-PGF2 α using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and association with elevated troponin levels. In: *Clin Biochem* 40 (2007), S. 1297–1304
- [103] YAN, Weiying ; BYRD, Gary D. ; OGDEN, Michael W.: Quantitation of isoprostane isomers in human urine from smokers and nonsmokers by LC-MS/MS. In: *J Lipid Res* 48 (2007), S. 1607–1617
- [104] DORJGOCHOO, Tsogzolmaa ; GAO, Yu-Tang ; CHOW, Wong-Ho ; SHU, Xiao-ou ; YANG, Gong ; CAI, Qiuyin ; ROTHMAN, Nathaniel ; CAI, Hui ; LI, Honglan ; DENG, Xinqing ; FRANKE, Adrian ; ROBERTS, L J. ; MILNE, Ginger ; ZHENG, Wei ; DAI, Qi: Major metabolite of F2-isoprostane in urine may be a more sensitive biomarker of oxidative stress than isoprostane itself. In: *Am J Clin Nutr* 96 (2012), S. 405–414
- [105] TSIKAS, Dimitrios ; SUCHY, Maria-Theresia: Protocols for the measurement of the F2-isoprostane, 15(S)-8-iso-prostaglandin F2 α , in biological samples by GC-MS or GC-MS/MS coupled with immunoaffinity column chromatography. In: *J Chromatogr B* 1019 (2016), S. 191–201
- [106] ERVE, Thomas J. ; KADIISKA, Maria B. ; LONDON, Stephanie J. ; MASON, Ronald P.: Classifying oxidative stress by F 2-isoprostane levels across human diseases: A meta-analysis. In: *Redox Biology* 12 (2017), S. 582–599

- [107] SIRCAR, Debajit ; SUBBAIAH, Papasani V.: Isoprostane measurement in plasma and urine by liquid chromatography-mass spectrometry with one-step sample preparation. In: *Clin Chem* 53 (2007), Nr. 2, S. 251–258
- [108] PRATICO, D. ; BARRY, O. P. ; LAWSON, J. A. ; ADIYAMAN, M. ; HWANG, S. W. ; KHANAPURE, S. P. ; IULIANO, L. ; ROKACH, J. ; FITZGERALD, G. A.: IPF2 α -I: an index of lipid peroxidation in humans. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), S. 3449–3454
- [109] THOMPSON, Henry J. ; HEIMENDINGER, Jerianne ; SEDLACEK, Scot ; HAEGELE, Albert ; DIKER, Ann ; O'NEILL, Caitlin ; MEINECKE, Becky ; WOLFE, Pamela ; ZHU, Zongjian ; JIANG, Weiqin: 8-Isoprostane F2 α excretion is reduced in women by increased vegetable and fruit intake. In: *Am J Clin Nutr* 82 (2005), S. 768–776
- [110] MILNE, Ginger L. ; SANCHEZ, Stephanie C. ; MUSIEK, Erik S. ; MORROW, Jason D.: Quantification of F2-isoprostanes as a biomarker of oxidative stress. In: *Nat Protoc* 2 (2007), Nr. 1, S. 221–226
- [111] PROUDFOOT, J. ; BARDEN, A. ; MORI, T. A. ; BURKE, V. ; CROFT, K. D. ; BEILIN, L. J. ; PUDDEY, I. B.: Measurement of urinary F2-isoprostanes as markers of in vivo lipid peroxidation—A comparison of enzyme immunoassay with gas chromatography/mass spectrometry. In: *Anal Biochem* 272 (1999), S. 209–215
- [112] BASU, Samar: Isoprostanes: novel bioactive products of lipid peroxidation. In: *Free Radic Res* 38 (2004), Nr. 2, S. 105–122
- [113] PROUDFOOT, Julie M. ; BARDEN, Anne E. ; LOKE, Wai M. ; CROFT, Kevin D. ; PUDDEY, Ian B. ; MORI, Trevor A.: HDL is the major lipoprotein carrier of plasma F2-isoprostanes. In: *J Lipid Res* 50 (2009), S. 716–722
- [114] O'BYRNE, S. ; FORTE, P. ; ROBERTS, L. J. ; MORROW, J. D. ; JOHNSTON, A. ; ANGGÅRD, E. ; LESLIE, R. D. ; BENJAMIN, N.: Nitric oxide synthesis and isoprostane production in subjects with type 1 diabetes and normal urinary albumin excretion. In: *Diabetes* 49 (2000), S. 857–862
- [115] BURKE, A. ; LAWSON, J. A. ; MEAGHER, E. A. ; ROKACH, J. ; FITZGERALD, G. A.: Specific analysis in plasma and urine of 2,3-dinor-5, 6-dihydro-isoprostane F2 α -III, a metabolite of isoprostane F2 α -III and an oxidation product of γ -linolenic acid. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 4, S. 2499–2504
- [116] CHIABRANDO, Chiara ; RIVALTA, Claudia ; BAGNATI, Renzo ; VALAGUSSA, Anna ; DURAND, Thierry ; GUY, Alexandre ; VILLA, Pia ; ROSSI, Jean-Claude ; FANELLI, Roberto: Identification of metabolites from type III F2-isoprostane diastereoisomers by mass spectrometry. In: *J Lipid Res* 43 (2002), S. 495–509
- [117] TSIKAS, D.: Application of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry to assess in vivo synthesis of prostaglandins, thromboxane, leukotrienes, isoprostanes and related compounds in humans. In: *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 717 (1998), S. 201–245
- [118] MILNE, Ginger L. ; GAO, Benlian ; TERRY, Erin S. ; ZACKERT, William E. ; SANCHEZ, Stephanie C.: Measurement of F2- isoprostanes and isofurans using gas chromatography-mass spectrometry. In: *Free Radic Biol Med* 59 (2013), S. 36–44
- [119] MILNE, Ginger L. ; DAI, Qi ; ROBERTS, L. J. 2nd: The isoprostanes—25 years later. In: *Biochim Biophys Acta* 1851 (2015), Nr. 4, S. 433–445
- [120] TSIKAS, Dimitrios: Measurement of free and glucuronic acid-conjugated 8-iso-prostaglandin F2 α by immunoaffinity chromatography and mass spectrometry. In: *Journal of Chromatography A* 1420 (2015), S. 135
- [121] TSIKAS, Dimitrios ; SUCHY, Maria-Theresia: Assessment of urinary F2-isoprostanes in experimental and clinical studies: mass spectrometry versus ELISA. In: *Hypertension* 60 (2012), S. e14

- [122] RYU, Yeonsuk ; REID, Malcolm J. ; THOMAS, Kevin V.: Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry with immunoaffinity clean-up for the determination of the oxidative stress biomarker 8-iso-prostaglandin F2 α in wastewater. In: *J Chromatogr A* 1409 (2015), S. 146–151
- [123] TSIKAS, Dimitrios ; HANFF, Erik: Lacking linearity in quantitative stable-isotope LC-MS/MS measurement of F2-isoprostanes is an irrefutable indicator of analytical inadequacy. In: *Journal of Chromatography B* 1064 (2017), S. 139–142
- [124] LANGHORST, Marsha L. ; HASTINGS, Michael J. ; YOKOYAMA, Wallace H. ; HUNG, Shao-Ching ; CELLAR, Nicholas ; KUPPANNAN, Krishna ; YOUNG, Scott A.: Determination of F2-isoprostanes in urine by online solid phase extraction coupled to liquid chromatography with tandem mass spectrometry. In: *J Agric Food Chem* 58 (2010), S. 6614–6620
- [125] CZERSKA, Marta ; MIKOLAJEWSKA, Karolina ; ZIELINSKI, Marek ; GROMADZINSKA, Jolanta ; WASOWICZ, Wojciech: Today's oxidative stress markers. In: *Medycyna Pracy* 66 (2015), Nr. 3, S. 393–405
- [126] RICHELLE, M ; TURINI, ME ; GUIDOUX, R ; TAVAZZI, I ; METAIRON, S ; FAY, LB: Urinary isoprostane excretion is not confounded by the lipid content of the diet. In: *FEBS Lett* 459 (1999), S. 259–262
- [127] GOPAUL, N. K. ; ZACHAROWSKI, K. ; HALLIWELL, B. ; ANGGÅRD, E. E.: Evaluation of the postprandial effects of a fast-food meal on human plasma F2-isoprostane levels. In: *Free Radic Biol Med* 28 (2000), Nr. 5, S. 806–814
- [128] BARDEN, Anne E. ; CROFT, Kevin D. ; DURAND, Thierry ; GUY, Alexandre ; MUELLER, Martin J. ; MORI, Trevor A.: Flaxseed oil supplementation increases plasma F1-phytoprostanes in healthy men. In: *J Nutr* 139 (2009), S. 1890–1895
- [129] CHIABRANDO, Chiara ; VALAGUSSA, Anna ; RIVALTA, Claudia ; DURAND, Thierry ; GUY, Alexandre ; ZUCCATO, Ettore ; VILLA, Pia ; ROSSI, Jean-Claude ; FANELLI, Roberto: Identification and measurement of endogenous β -oxidation metabolites of 8-epi-prostaglandin F2 α . In: *J Biol Chem* 274 (1999), Nr. 3, S. 1313–1319
- [130] HALLIWELL, B.: Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. In: *Nutr Rev* 57 (1999), Nr. 4, S. 104–113
- [131] TSIKAS, Dimitrios: Quantitative analysis of biomarkers, drugs and toxins in biological samples by immunoaffinity chromatography coupled to mass spectrometry or tandem mass spectrometry: A focused review of recent applications. In: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878 (2010), S. 133–148
- [132] KULIGOWSKI, Julia ; ESCOBAR, Javier ; QUINTÁS, Guillermo ; LLISO, Isabel ; TORRES-CUEVAS, Isabel ; NUÑEZ, Antonio ; CUBELLS, Elena ; ROOK, Denise ; GOUDOEVER, Johannes B. ; VENTO, Máximo: Analysis of lipid peroxidation biomarkers in extremely low gestational age neonate urines by UPLC-MS/MS. In: *Anal Bioanal Chem* 406 (2014), S. 4345–4356
- [133] HALLIWELL, Barry ; WHITEMAN, Matthew: Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? In: *Br J Pharmacol* 142 (2004), S. 231–255
- [134] GRECO, A. ; MINGHETTI, L. ; LEVI, G.: Isoprostanes, novel markers of oxidative injury, help understanding the pathogenesis of neurodegenerative diseases. In: *Neurochem Res* 25 (2000), Nr. 9-10, S. 1357–1364
- [135] MORROW, Jason D. ; ROBERTS, L J.: Mass spectrometry of prostanoids: F 2-isoprostanes produced by non-cyclooxygenase free radical-catalyzed mechanism. In: *Methods Enzymol* 233 (1994), S. 163–174
- [136] MUSIEK, Erik S. ; MORROW, Jason D.: Quantification of F 2-Isoprostanes by Gas Chromatography/Mass Spectrometry as a Measure of Oxidant Stress. In: *Curr Protoc Toxicol* 24 (2005), Nr. 1, S. 17.6.1 – 17.6.9

- [137] TAYLOR, Alan W. ; BRUNO, Richard S. ; FREI, Balz ; TRABER, Maret G.: Benefits of prolonged gradient separation for high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantitation of plasma total 15-series F-isoprostanes. In: *Anal Biochem* 350 (2006), S. 41–51
- [138] BASTANI, Nasser E. ; GUNDERSEN, Thomas E. ; BLOMHOFF, Rune: Determination of 8-epi PGF 2α concentrations as a biomarker of oxidative stress using triple-stage liquid chromatography/tandem mass spectrometry. In: *Rapid Commun Mass Spectrom* 23 (2009), S. 2885–2890
- [139] SYSLOVÁ, Kamila ; KACER, Petr ; KUZMA, Marek ; NAJMANOVÁ, Vera ; FENCLOVÁ, Zdenka ; VLCKOVÁ, Stepánka ; LEBEDOVÁ, Jindriska ; PELCLOVÁ, Daniela: Rapid and easy method for monitoring oxidative stress markers in body fluids of patients with asbestos or silica-induced lung diseases. In: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877 (2009), S. 2477–2486
- [140] TAYLOR, Alan W. ; TRABER, Maret G.: Quantitation of plasma total 15-series F 2 -isoprostanes by sequential solid phase and liquid-liquid extraction. In: *Anal Biochem* 396 (2010), S. 319–321
- [141] TSIKAS, Dimitrios ; SCHWEDHELM, Edzard ; SUCHY, Maria T. ; NIEMANN, Jonas ; GUTZKI, Frank M. ; ERPENBECK, Veit J. ; HOHLFELD, Jens M. ; SURDACKI, Andrzej ; FRÖLICH, Jürgen C.: Divergence in urinary 8-iso-PGF 2α (iPF 2α -III, 15-F(2t)-IsoP) levels from gas chromatography-tandem mass spectrometry quantification after thin-layer chromatography and immunoaffinity column chromatography reveals heterogeneity of 8-iso-PGF 2α . Possible methodological, mechanistic and clinical implications. In: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 794 (2003), S. 237–255
- [142] SCHWEDHELM, E. ; BENNDORF, R.A. ; BOGER, R.H. ; TSIKAS, D.: Mass Spectrometric Analysis of F 2 -Isoprostanes: Markers and Mediators in Human Disease. In: *Current Pharmaceutical Analysis* 3 (2007), S. 39–51
- [143] MESAROS, Clementina ; LEE, Seon H. ; BLAIR, Ian A.: Targeted quantitative analysis of eicosanoid lipids in biological samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877 (2009), S. 2736–2745
- [144] TSIKAS, D. ; SCHWEDHELM, E. ; FAULER, J. ; GUTZKI, F. M. ; MAYATEPEK, E. ; FRÖLICH, J. C.: Specific and rapid quantification of 8-iso-prostaglandin F 2α in urine of healthy humans and patients with Zellweger syndrome by gas chromatography-tandem mass spectrometry. In: *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 716 (1998), S. 7–17
- [145] ZHAO, Z. ; HJELM, N. M. ; LAM, C. W. ; HO, C. S.: One-step solid-phase extraction procedure for F 2 -isoprostanes. In: *Clin Chem* 47 (2001), Nr. 7, S. 1306–1308
- [146] LEE, Chung-Yung J. ; HUANG, Shan H. ; JENNER, Andrew M. ; HALLIWELL, Barry: Measurement of F 2 -isoprostanes, hydroxyeicosatetraenoic products, and oxysterols from a single plasma sample. In: *Free Radic Biol Med* 44 (2008), S. 1314–1322
- [147] STERZ, Katharina ; SCHERER, Gerhard ; ECKER, Josef: A simple and robust UPLC-SRM/MS method to quantify urinary eicosanoids. In: *J Lipid Res* 53 (2012), S. 1026–1036
- [148] BESSARD, J. ; CRACOWSKI, J. L. ; STANKE-LABESQUE, F. ; BESSARD, G.: Determination of isoprostaglandin F 2α type III in human urine by gas chromatography-electronic impact mass spectrometry. Comparison with enzyme immunoassay. In: *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 754 (2001), S. 333–343
- [149] CALLEWAERT, Denis: Do Isoprostane Immunoassays Provide Reliable Quantification of Oxidative Stress? In: *Oxford Biomedical Research* (2004)
- [150] CHU, Xiaoqing ; AGEISHI, Yuji ; NISHIMURA, Kohji ; JISAKA, Mitsuo ; NAGAYA, Tsutomu ; SHONO, Fumiaki ; YOKOTA, Kazushige: Development of enzyme-linked immunosorbent assay for 8-iso-prostaglandin F 2α , a biomarker of oxidative stress in vivo, and its application to the quantification in aged rats. In: *J Pharm Biomed Anal* 50 (2009), S. 911–916
- [151] DAHL, Jeffrey H. ; BREEMEN, Richard B.: Rapid quantitative analysis of 8-iso-prostaglandin-F(2alpha) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with an enzyme immunoassay method. In: *Anal Biochem* 404 (2010), S. 211–216

- [152] SMITH, K A. ; SHEPHERD, J ; WAKIL, A ; KILPATRICK, E S.: A comparison of methods for the measurement of 8-isoPGF2 α : a marker of oxidative stress. In: *Annals of Clinical Biochemistry* 48 (2011), S. 147–154
- [153] BIELECKI, A. ; SARAVANABHAVAN, G. ; BLAIS, E. ; VINCENT, R. ; KUMARATHASAN, P.: An Efficient Sample Preparation Method for High-Throughput Analysis of 15(S)-8-iso-PGF2 α in Plasma and Urine by Enzyme Immunoassay. In: *J Anal Toxicol* 36 (2012), S. 595–600
- [154] MIZUNO, Keisuke ; KATAOKA, Hiroyuki: Analysis of urinary 8-isoprostane as an oxidative stress biomarker by stable isotope dilution using automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *J Pharm Biomed Anal* 112 (2015), S. 36–42
- [155] KLAWITTER, Jelena ; HASCHKE, Manuel ; SHOKATI, Touraj ; KLAWITTER, Jost ; CHRISTIANS, Uwe: Quantification of 15-F2t-isoprostane in human plasma and urine: results from enzyme-linked immunoassay and liquid chromatography/tandem mass spectrometry cannot be compared. In: *Rapid Commun Mass Spectrom* 25 (2011), Nr. 4, S. 463–468
- [156] MUSIEK, Erik S. ; MORROW, Jason D.: F2-Isoprostanes as Markers of Oxidant Stress: An Overview. In: *Curr Protoc Toxicol* 24 (2005), Nr. 1, S. 17.5.1 – 17.5.10
- [157] ROBERTS, L. J. ; MILNE, Ginger L.: Isoprostanes. In: *J Lipid Res* 50 (2009), S. S219–S223
- [158] BERDEAUX, Olivier ; SCRUEL, Olivier ; CRACOWSKI, Jean L. ; DURAND, Thierry: F2-Isoprostanes: Review of Analytical Methods. In: *Current Pharmaceutical Analysis* 2 (2006), S. 69–78
- [159] CHÁFER-PERICÁS, C ; RAHKONEN, L ; SÁNCHEZ-ILLANA, A ; KULIGOWSKI, J ; TORRES-CUEVAS, I ; CERNADA, M ; CUBELLS, E ; NUÑEZ-RAMIRO, A ; ANDERSSON, S ; VENTO, M ; ESCOBAR, J: Ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry determination of lipid peroxidation biomarkers in newborn serum samples. In: *Analytica Chimica Acta* 886 (2015), S. 214–220
- [160] MATEOS, Raquel ; BRAVO, Laura: Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). In: *J Sep Sci* 30 (2007), S. 175–191
- [161] MORROW, J. D. ; ZACKERT, W. E. ; YANG, J. P. ; KURHTS, E. H. ; CALLEWAERT, D. ; DWORSKI, R. ; KANAI, K. ; TABER, D. ; MOORE, K. ; OATES, J. A. ; ROBERTS, L. J.: Quantification of the major urinary metabolite of 15-F2t-isoprostane (8-iso-PGF2 α) by a stable isotope dilution mass spectrometric assay. In: *Anal Biochem* 269 (1999), S. 326–331
- [162] SCHWEDHELM, E. ; TSIKAS, D. ; DURAND, T. ; GUTZKI, F. M. ; GUY, A. ; ROSSI, J. C. ; FRÖLICH, J. C.: Tandem mass spectrometric quantification of 8-iso-prostaglandin F2 α and its metabolite 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-prostaglandin F2 α in human urine. In: *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 744 (2000), S. 99–112
- [163] OBATA, T.: Strategy and principles of the simultaneous analysis of prostanoids by gas chromatography/mass spectrometry/selected-ion monitoring. In: *Analytica Chimica Acta* 465 (2002), S. 379–393
- [164] LEE, Chung-Yung J. ; JENNER, Andrew M. ; HALLIWELL, Barry: Rapid preparation of human urine and plasma samples for analysis of F2-isoprostanes by gas chromatography-mass spectrometry. In: *Biochem Biophys Res Commun* 320 (2004), S. 696–702
- [165] NOUROOZ-ZADEH, J. ; COOPER, M. B. ; ZIEGLER, D. ; BETTERIDGE, D. J.: Urinary 8-epi-PGF2 α and its endogenous β -oxidation products (2,3-dinor and 2,3-dinor-5,6-dihydro) as biomarkers of total body oxidative stress. In: *Biochem Biophys Res Commun* 330 (2005), S. 731–736
- [166] MAS, Emilie ; MICHEL, Françoise ; GUY, Alexandre ; BULTEL, Valérie ; FALQUET, Yoan ; CHARDON, Patrick ; ROSSI, Jean-Claude ; CRISTOL, Jean P. ; DURAND, Thierry: Quantification of urinary F2-isoprostanes with 4(RS)-F4t-neuroprostane as an internal standard using gas

- chromatography-mass spectrometry Application to polytraumatized patients. In: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 872 (2008), S. 133–140
- [167] LIU, Wei ; MORROW, Jason D. ; YIN, Huiyong: Quantification of F2-isoprostanes as a reliable index of oxidative stress in vivo using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method. In: *Free Radic Biol Med* 47 (2009), S. 1101–1107
- [168] LEE, Yiu Y. ; GALANO, Jean-Marie ; OGER, Camille ; VIGOR, Claire ; GUILLAUME, Reversat ; ROY, Jérôme ; LE GUENNEC, Jean-Yves ; DURAND, Thierry ; LEE, Jetty Chung-Yung: Assessment of Isoprostanes in Human Plasma: Technical Considerations and the Use of Mass Spectrometry. In: *Lipids* 51 (2016), S. 1217–1229
- [169] LI, H. ; LAWSON, J. A. ; REILLY, M. ; ADIYAMAN, M. ; HWANG, S. W. ; ROKACH, J. ; FITZGERALD, G. A.: Quantitative high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of the four classes of F2-isoprostanes in human urine. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), Nr. 23, S. 13381–13386
- [170] MASOODI, Mojgan ; NICOLAOU, Anna: Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. In: *Rapid Commun Mass Spectrom* 20 (2006), S. 3023–3029
- [171] ZHANG, Bo ; SAKU, Keijiro: Control of matrix effects in the analysis of urinary F2-isoprostanes using novel multidimensional solid-phase extraction and LC-MS/MS. In: *J Lipid Res* 48 (2007), S. 733–744
- [172] SICILIA, Tina ; MALLY, Angela ; SCHAUER, Ute ; PÄHLER, Axel ; VÖLKEL, Wolfgang: LC-MS/MS methods for the detection of isoprostanes (iPF2 α -III and 8,12-iso-iPF2 α -VI) as biomarkers of CCl4-induced oxidative damage to hepatic tissue. In: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 861 (2008), S. 48–55
- [173] CAVALCA, Viviana ; MINARDI, Fabiana ; SCURATI, Samuele ; GUIDUGLI, Federico ; SQUELLERIO, Isabella ; VEGLIA, Fabrizio ; DAINESE, Luca ; GUARINO, Anna ; TREMOLI, Elena ; CARUSO, Donatella: Simultaneous quantification of 8-iso-prostaglandin-F2 α and 11-dehydro thromboxane B2 in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *Anal Biochem* 397 (2010), S. 168–174
- [174] MEDINA, S. ; DOMÍNGUEZ-PERLES, R. ; GIL, J. I. ; FERRERES, F. ; GARCÍA-VIGUERA, C. ; MARTÍNEZ-SANZ, J. M. ; GIL-IZQUIERDO, A.: A ultra-pressure liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry method for the analysis of 13 eicosanoids in human urine and quantitative 24 hour values in healthy volunteers in a controlled constant diet. In: *Rapid Commun Mass Spectrom* 26 (2012), S. 1249–1257
- [175] PRASAIN, Jeevan K. ; ARABSHAHI, Alireza ; TAUB, Pam R. ; SWEENEY, Scott ; MOORE, Ray ; SHARER, J D. ; BARNES, Stephen: Simultaneous quantification of F2-isoprostanes and prostaglandins in human urine by liquid chromatography tandem-mass spectrometry. In: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 913-914 (2013), S. 161–168
- [176] HOLCAPEK, Michal ; JIRÁSKO, Robert ; LÍSA, Miroslav: Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. In: *J Chromatogr A* 1259 (2012), S. 3–15
- [177] AUERBACH, David ; ASPENLEITER, Julia ; VOLMER, Dietrich A.: Description of gas-phase ion/neutral interactions in differential ion mobility spectrometry: CV prediction using calibration runs. In: *J Am Soc Mass Spectrom* 25 (2014), Nr. 9, S. 1610–1621
- [178] CAMPBELL, Larry J. ; BLANC, Yves C J L. ; KIBBEY, Richard G.: Differential mobility spectrometry: a valuable technology for analyzing challenging biological samples. In: *Bioanalysis* 7 (2015), Nr. 7, S. 853–856
- [179] SCHNEIDER, Bradley B. ; NAZAROV, Erkinjon G. ; LONDRY, Frank ; VOUIROS, Paul ; COVEY, Thomas R.: Differential mobility spectrometry/mass spectrometry history, theory, design optimization, simulations, and applications. In: *Mass Spectrom Rev* 35 (2016), Nr. 6, S. 687–737

- [180] SHVARTSBERG, Alexandre A.: *Differential Ion Mobility Spectrometry*. CRC Press, 2009
- [181] SCHNEIDER, Bradley B. ; COVEY, Thomas R. ; COY, Stephen L. ; KRYLOV, Evgeny V. ; NAZAROV, Erkinjon G.: Planar differential mobility spectrometer as a pre-filter for atmospheric pressure ionization mass spectrometry. In: *International journal of Mass Spectrometry* 298 (2010), S. 45–54
- [182] LANUCARA, Francesco ; HOLMAN, Stephen W. ; GRAY, Christopher J. ; EYERS, Claire E.: The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. In: *Nature Chemistry* 6 (2014), S. 281–294
- [183] COY, Stephen L. ; KRYLOV, Evgeny V. ; SCHNEIDER, Bradley B. ; COVEY, Thomas R. ; BRENNER, David J. ; TYBURSKI, John B. ; PATTERSON, Andrew D. ; KRAUSZ, Kris W. ; FORNACE, Albert J. ; NAZAROV, Erkinjon G.: Detection of Radiation-Exposure Biomarkers by Differential Mobility Prefiltered Mass Spectrometry (DMS-MS). In: *International Journal of Mass Spectrometry* 291 (2010), S. 108–117
- [184] KANU, Abu B. ; DWIVEDI, Prabha ; TAM, Maggie ; MATZ, Laura ; HILL, Herbert H.: Ion mobility-mass spectrometry. In: *J Mass Spectrom* 43 (2008), S. 1–22
- [185] LAPHORN, Cris ; PULLEN, Frank ; CHOWDHRY, Babur Z.: Ion mobility spectrometry-mass spectrometry (IMS-MS) of small molecules: separating and assigning structures to ions. In: *Mass Spectrom Rev* 32 (2012), S. 43–71
- [186] LAMBERT, W: Pitfalls in LC–MS (–MS) analysis. In: *Toxichem Krimtech* 71 (2004), Nr. 2, S. 64–68
- [187] SNYDER, Lloyd R. ; KIRKLAND, Joseph J. ; DOLAN, John W.: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Bd. Third Edition. Wiley, 2010
- [188] SYSLOVÁ, Kamila ; KACER, Petr ; KUZMA, Marek ; KLUSÁCKOVÁ, Pavlína ; FENCLOVÁ, Zdena ; LEBEDOVÁ, Jindriská ; PELCLOVÁ, Daniela: Determination of 8-iso-prostaglandin F2 α in exhaled breath condensate using combination of immunoseparation and LC-ESI-MS/MS. In: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 867 (2008), S. 8–14
- [189] JANICKA, Monika ; KOT-WASIK, Agata ; PARADZIEJ-ŁUKOWICZ, Jolanta ; SULARZ-PESZYŃSKA, Grazyna ; BARTOSZEK, Agnieszka ; NAMIESNIK, Jacek: LC-MS/MS Determination of Isoprostanes in Plasma Samples Collected from Mice Exposed to Doxorubicin or Tert-Butyl Hydroperoxide. In: *Int J Mol Sci* 14 (2013), S. 6157–6169
- [190] SAHADEVAN, Sabu ; OW, Sawyen ; CHIEN, Kun-Yi ; CHI, Lang-Ming ; YU, Jau-Song: *Solving the Controversy Surrounding the Marker Fragment at 193 for the Positive Identification of 8-iso Prostaglandin F2 α* . ASMS 2015 Bruker Poster Number: ThP114, 2015
- [191] VIGOR, Claire ; BERTRAND-MICHEL, Justine ; PINOT, Edith ; OGER, Camille ; VERCAUTEREN, Joseph ; LE FAUDER, Pauline ; GALANO, Jean-Marie ; LEE, Jetty Chung-Yung ; DURAND, Thierry: Non-enzymatic lipid oxidation products in biological systems: assessment of the metabolites from polyunsaturated fatty acids. In: *Journal of Chromatography B* 964 (2014), S. 65–78
- [192] RUND, Katharina M. ; OSTERMANN, Annika I. ; KUTZNER, Laura ; GALANO, Jean-Marie ; OGER, Camille ; VIGOR, Claire ; WECKLEIN, Sabine ; SEIWERT, Nina ; DURAND, Thierry ; SCHEBB, Nils H.: Development of an LC-ESI(–)-MS/MS method for the simultaneous quantification of 35 isoprostanes and isofurans derived from the major n3-and n6-PUFAs. In: *Analytica Chimica Acta* 1037 (2018), S. 63–74
- [193] KRUIVE, Anneli ; REBANE, Riin ; KIPPER, Karin ; OLDEKOP, Maarja-Liisa ; EVARD, Hanno ; HERODES, Koit ; RAVIO, Pekka ; LEITO, Ivo: Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: part I. In: *Analytica Chimica Acta* 870 (2015), S. 29–44
- [194] KRUIVE, Anneli ; REBANE, Riin ; KIPPER, Karin ; OLDEKOP, Maarja-Liisa ; EVARD, Hanno ; HERODES, Koit ; RAVIO, Pekka ; LEITO, Ivo: Tutorial review on validation of liquid

- chromatography-mass spectrometry methods: part II. In: *Analytica Chimica Acta* 870 (2015), S. 8–28
- [195] KROMIDAS, Stavros ; KUSS, Hans-Joachim: *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC*. John Wiley & Sons, 2008
- [196] FDA: *Guidance for Industry: Bioanalytical method validation, Draft Guidance, U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration*. 2013
- [197] EMA: *Guideline on bioanalytical method validation, European Medicines Agency*. 2012
- [198] SANTE: *SANTE/11945/2015, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed*. 2016
- [199] MATUSZEWSKI, B. K. ; CONSTANZER, M. L. ; CHAVEZ-ENG, C. M.: Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. In: *Anal Chem* 75 (2003), S. 3019–3030
- [200] MAGNUSSON, Bertil ; ÖRNEMARK, Ulf ; MAGNUSSON, B. (Hrsg.) ; ÖRNEMARK, U. (Hrsg.): *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd Edition 2014*. Eurachem, 2014
- [201] NMKL: *NordVal Protocol No. 2, Guide in validation of alternative proprietary chemical methods, Nordic Committee on Food Analysis*. 2010
- [202] ICH: *ICH harmonized tripartite guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), International Conference of harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*. 2005
- [203] ARNDT, Torsten: Urin-Kreatininkonzentration: Kenngröße zur Prüfung auf Probenverwertbarkeit? Kritische Überlegungen aus ca. 25000 Urin-Kreatininbestimmungen in einem klinisch-chemischen Labor. In: *Toxichem Krimtech* 74 (2007), Nr. 2, S. 94–99
- [204] ARNDT, Torsten: Urine-creatinine concentration as a marker of urine dilution: reflections using a cohort of 45,000 samples. In: *Forensic Sci Int* 186 (2009), S. 48–51
- [205] FORMAN, Henry J. ; AUGUSTO, Ohara ; BRIGELIUS-FLOHE, Regina ; DENNERY, Phyllis A. ; KALYANARAMAN, Balaraman ; ISCHIROPOULOS, Harry ; MANN, Giovanni E. ; RADİ, Rafael ; ROBERTS, L J. 2nd ; VINA, Jose ; DAVIES, Kelvin J A.: Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology. In: *Free Radic Biol Med* 78 (2015), S. 233–235
- [206] KADIISKA, M. B. ; GLADEN, B. C. ; BAIRD, D. D. ; GERMOLÉC, D. ; GRAHAM, L. B. ; PARKER, C. E. ; NYSKA, A. ; WACHSMAN, J. T. ; AMES, B. N. ; BASU, S. ; BROTH, N. ; FITZGERALD, G. A. ; FLOYD, R. A. ; GEORGE, M. ; HEINECKE, J. W. ; HATCH, G. E. ; HENSLEY, K. ; LAWSON, J. A. ; MARNETT, L. J. ; MORROW, J. D. ; MURRAY, D. M. ; PLASTARAS, J. ; ROBERTS, L. J. ; ROKACH, J. ; SHIGENAGA, M. K. ; SOHAL, R. S. ; SUN, J. ; TICE, R. R. ; THIEL, D. H. V. ; WELLNER, D. ; WALTER, P. B. ; TOMER, K. B. ; MASON, R. P. ; BARRETT, J. C.: Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl4 poisoning? In: *Free Radic Biol Med* 38 (2005), S. 698–710
- [207] DAUGHTON, Christian G.: Using biomarkers in sewage to monitor community-wide human health: Isoprostanes as conceptual prototype. In: *Science of the Total Environment* 424 (2012), S. 16–38
- [208] IL'YASOVA, Dora ; SPASOJEVIC, Ivan ; WANG, Frances ; TOLUN, Advije A. ; BASE, Karel ; YOUNG, Sarah P. ; MARCOM, P K. ; MARKS, Jeffrey ; MIXON, Gabriel ; DIGIULIO, Richard u. a.: Urinary biomarkers of oxidative status in a clinical model of oxidative assault. In: *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 19 (2010), S. 1506–1510
- [209] EFSA: Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies Guidance on the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health. In: *EFSA Journal* 9 (2011), Nr. 12, S. 2474–2487

- [210] KROMIDAS, Stavros: *Validierung in der Analytik*. John Wiley & Sons, 2011
- [211] BOYD, Robert K. ; BASIC, Cecilia ; BETHEM, Robert A.: *Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, 2008
- [212] FONTANALS, Nuria ; CORMACK, Peter A. ; MARCE, Rosa M. ; BORULL, Francesc: Mixed-mode ion-exchange polymeric sorbents: dual-phase materials that improve selectivity and capacity. In: *Trends in Analytical Chemistry* 29 (2010), Nr. 7, S. 765–779
- [213] TSIKAS, Dimitrios ; ZOERNER, Alexander A.: Analysis of eicosanoids by LC-MS/MS and GC-MS/MS: A historical retrospect and a discussion. In: *Journal of Chromatography B* 964 (2014), S. 79–88
- [214] XIAO, Yi ; FU, Xiaowei ; PATTENGAL, Paul ; BARD, Jennifer D. ; XU, Yan-Kang ; O'GORMAN, Maurice R.: A sensitive LC-MS/MS method for the quantification of urinary 8-iso-prostaglandin F 2 α (8-iso-PGF 2 α) including pediatric reference interval. In: *Clinica Chimica Acta* 460 (2016), S. 128–134
- [215] LIANG, Chunsu ; SUN, Hui ; MENG, Xiangjun ; YIN, Lei ; FAWCETT, J P. ; YU, Huaidong ; LIU, Ting ; GU, Jingkai: Separation and simultaneous quantitation of PGF2 α and its epimer 8-iso-PGF2 α using modifier-assisted differential mobility spectrometry tandem mass spectrometry. In: *Acta Pharmaceutica Sinica B* 8 (2018), Nr. 2, S. 228–234
- [216] MARTINEZ, Maria P. ; KANNAN, Kurunthachalam: Simultaneous Analysis of Seven Biomarkers of Oxidative Damage to Lipids, Proteins, and DNA in Urine. In: *Environ Sci Technol* 52 (2018), Nr. 11, S. 6647–6655
- [217] MARTINEZ-MORAL, Maria P. ; KANNAN, Kurunthachalam: How stable is oxidative stress level? An observational study of intra- and inter-individual variability in urinary oxidative stress biomarkers of DNA, proteins, and lipids in healthy individuals. In: *Environ Int* 123 (2019), S. 382–389
- [218] MARTINEZ-MORAL, Maria P. ; KANNAN, Kurunthachalam: Allantoin as a Marker of Oxidative Stress: inter- and Intraindividual Variability in Urinary Concentrations in Healthy individuals. In: *Environ Sci Technol* 6 (2019), S. 283–288
- [219] BURGOS, Carlos ; HENRÍQUEZ-OLGUÍN, Carlos ; ANDRADE, David C. ; RAMÍREZ-CAMPILLO, Rodrigo ; ARANEDA, Oscar F. ; WHITE, Allan ; CERDA-KOHLER, Hugo: Effects of Exercise Training under Hyperbaric Oxygen on Oxidative Stress Markers and Endurance Performance in Young Soccer Players: A Pilot Study. In: *Journal of Nutrition and Metabolism* 2016 (2016)
- [220] PHILLIPS, M ; CATANEO, RN ; GREENBERG, J ; GRODMAN, R ; GUNAWARDENA, R ; NAIDU, A: Effect of oxygen on breath markers of oxidative stress. In: *Eur Respir J* 21 (2003), S. 48–51
- [221] CORCORAN, Tomas ; TING, Sonya ; MAS, Emilie ; PHILLIPS, Michael ; O'LOUGHLIN, Edmond ; BARDEN, Anne ; MORI, Trevor A.: Hyperbaric oxygen therapy is not associated with oxidative stress assessed using plasma F2-isoprostanes and isofurans. In: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 127 (2017), S. 16–19
- [222] LEMAITRE, F ; MEUNIER, N ; BEDU, M: Effect of air diving exposure generally encountered by recreational divers: Oxidative stress? In: *Undersea & Hyperbaric Medicine* 29 (2002), Nr. 1, S. 39–49
- [223] ALCARAZ-GARCÍA, MJ ; ALBALADEJO, MD ; ACEVEDO, C ; OLEA, A ; ZAMORA, S ; MARTÍNEZ, P ; PARRA, S: Effects of hyperoxia on biomarkers of oxidative stress in closed-circuit oxygen military divers. In: *J Physiol Biochem* 64 (2008), Nr. 2, S. 135–141
- [224] WATSON, Trent A. ; MACDONALD-WICKS, Lesley K. ; GARG, Manohar L.: Oxidative stress and antioxidants in athletes undertaking regular exercise training. In: *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 15 (2005), S. 131–146
- [225] LEE, Sangseok ; LEE, Dong K.: What is the proper way to apply the multiple comparison test? In: *Korean J Anesthesiol* 71 (2018), Nr. 5, S. 353–361

- [226] SCHNEIDER, Astrid ; HOMMEL, Gerhard ; BLETNER, Maria: Linear regression analysis - part 14 of a series on evaluation of scientific publications. In: *Dtsch Arztebl Int* 107 (2010), Nr. 44, S. 776–782
- [227] ASZYK, Justyna ; KOT, Jacek ; TKACHENKO, Yurii ; WOŹNIAK, Michał ; BOGUCKA-KOCKA, Anna ; KOT-WASIK, Agata: Novel liquid chromatography method based on linear weighted regression for the fast determination of isoprostane isomers in plasma samples using sensitive tandem mass spectrometry detection. In: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1051 (2017), S. 17–23
- [228] GOSS, Victoria ; CAZENAVE-GASSIOT, Amaury ; PRINGLE, Ashley ; POSTLE, Anthony: Investigation of Isoprostanes as Potential Biomarkers for Alzheimer's Disease Using Chiral LC-MS/MS and SFC-MS/MS. In: *Current Analytical Chemistry* 10 (2014), S. 121–131
- [229] IL'YASOVA, Dora ; SCARBROUGH, Peter ; SPASOJEVIC, Ivan: Urinary biomarkers of oxidative status. In: *Clinica Chimica Acta* 413 (2012), S. 1446–1453
- [230] HELMERSSON, Johanna ; VESSBY, Bengt ; LARSSON, Anders ; BASU, Samar: Association of Type 2 Diabetes With Cyclooxygenase-Mediated Inflammation and Oxidative Stress in an Elderly Population. In: *Circulation* 109 (2004), S. 1729–1734
- [231] HELMERSSON, J. ; LARSSON, A. ; VESSBY, B. ; BASU, S.: Active smoking and a history of smoking are associated with enhanced prostaglandin F₂ α , interleukin-6 and F₂-isoprostane formation in elderly men. In: *Atherosclerosis* 181 (2005), S. 201–207
- [232] BARDEN, Anne ; ZILKENS, Renate R. ; CROFT, Kevin ; MORI, Trevor ; BURKE, Valerie ; BEILIN, Lawrence J. ; PUDDEY, Ian B.: A reduction in alcohol consumption is associated with reduced plasma F₂-Isoprostanes and urinary 20-HETE excretion in men. In: *Free Radic Biol Med* 42 (2007), S. 1730–1735
- [233] ARUOMA, Okezie I.: Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. In: *JAACS* 75 (1998), Nr. 2, S. 199–212
- [234] KÄHLER, Wataru ; TILLMANS, Frauke ; KLAPA, Sebastian ; KOCH, Inga ; LAST, Julia ; KOCH, Andreas: Oxidativer Stress durch hyperbare Hyperoxie und dessen Wirkung auf periphere mononukleäre Zellen (PBMC) - eine Übersicht über den aktuellen Forschungsstand am Schiffahrtsmedizinischen Institut der Marine. In: *Wehrmedizinische Monatsschrift* 2 (2016), S. 50–55
- [235] TAGESSON, Christer ; KÄLLBERG, Magnus ; WINGREN, Gun: Urinary malondialdehyde and 8-hydroxydeoxyguanosine as potential markers of oxidative stress in industrial art glass workers. In: *International Archives of Occupational and Environmental Health* 69 (1996), S. 5
- [236] BADER, Nicolle ; BOSY-WESTPHAL, Anja ; KOCH, Andreas ; RIMBACH, Gerald ; WEIMANN, Allan ; POULSEN, Henrik E. ; MÜLLER, Manfred J.: Effect of hyperbaric oxygen and vitamin C and E supplementation on biomarkers of oxidative stress in healthy men. In: *The British Journal of Nutrition* 98 (2007), S. 826–833
- [237] MÁLYUSZ, M ; KÄHLER, W ; GRONOW, G: Hippurate metabolism as a hydroxyl radical trapping mechanism in the rat kidney. In: *Kidney Blood Press Res* 24 (2001), S. 149–158
- [238] PANOV, A.: Perhydroxyl Radical (HO₂^{*}) as Inducer of the Isoprostane Lipid Peroxidation in Mitochondria. In: *Molecular Biology* 52 (2018), Nr. 3, S. 295–305
- [239] FESSEL, Joshua P. ; PORTER, Ned A. ; MOORE, Kevin P. ; SELLER, James R. ; ROBERTS, L. J.: Discovery of lipid peroxidation products formed in vivo with a substituted tetrahydrofuran ring (isofurans) that are favored by increased oxygen tension. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Nr. 26, S. 16713–16718
- [240] ROBERTS, L. J. ; FESSEL, Joshua P.: The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran pathways of lipid peroxidation. In: *Chem Phys Lipids* 128 (2004), S. 173–186
- [241] TABER, Douglass F. ; FESSEL, Joshua P. ; ROBERTS, L. J.: A nomenclature system for isofurans. In: *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 73 (2004), S. 47–50

- [242] FESSEL, Joshua P. ; ROBERTS, L. J.: Isofurans: novel products of lipid peroxidation that define the occurrence of oxidant injury in settings of elevated oxygen tension. In: *Antioxid Redox Signal* 7 (2005), Nr. 1-2, S. 202–209
- [243] MORROW, J D. ; ROBERTS, L J. ; DANIEL, V C. ; AWAD, J A. ; MIROCHNITCHENKO, O ; SWIFT, L L. ; BURK, R F.: Comparison of formation of D2/E2-isoprostanes and F2-isoprostanes in vitro and in vivo—effects of oxygen tension and glutathione. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 353 (1998), Nr. 1, S. 160–171
- [244] MONTINE, Thomas J. ; MONTINE, Kathleen S. ; REICH, Erin E. ; TERRY, Erin S. ; PORTER, Ned A. ; MORROW, Jason D.: Antioxidants significantly affect the formation of different classes of isoprostanes and neuroprostanes in rat cerebral synaptosomes. In: *Biochemical Pharmacology* 65 (2003), S. 611–617